Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
Abteilung für Urologie
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-H. Bichler

# ERFASSUNG MUTAGENER AKTIVITÄTEN IM URIN VON HARNBLASENKARZINOMPATIENTEN, PHENACETINABUSERN UND PATIENTEN UNTER ZYTOSTATIKATHERAPIE MIT HILFE DES BAKTERIELLEN MUTAGENITÄTSTESTS NACH AMES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

HARTMUT DIETRICH
aus Dagersheim

1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0117

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
Abteilung für Urologie
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-H. Bichler

# ERFASSUNG MUTAGENER AKTIVITÄTEN IM URIN VON HARNBLASENKARZINOMPATIENTEN, PHENACETINABUSERN UND PATIENTEN UNTER ZYTOSTATIKATHERAPIE MIT HILFE DES BAKTERIELLEN MUTAGENITÄTSTESTS NACH AMES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

HARTMUT DIETRICH
aus Dagersheim

1987

Dekan: Professor Dr. J. Dichgans
1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Harzmann
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Schweinsberg

Für das Zustandekommen der Arbeit bedanke ich mich bei allen Beteiligten.

Unterstützung erfuhr ich insbesondere von Herrn Prof. Dr. Harzmann, sowie von Frau Gaiser, Frau Krug und Herrn Schreiber.

Mein Dank gilt weiterhin der mikrobiologischen Abteilung (Dr. Hein) der Fa. Byk-Gulden, die mich mit den Testerstämmen und Erfahrungswerten ausstattete.

Weiter danke ich Frau Priv. Doz. Dr. Heidemann und dem Pflegepersonal der Medizinischen Klinik Tübingen für ihre Mithilfe.

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| | 1.1. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms | 1 |
| | 1.2. Präventive Onkologie | 3 |
| | 1.2.1. In-vitro Testverfahren | 4 |
| | 1.2.2. Mutagenitätsnachweis im Urin | 7 |
| 2. | MATERIAL UND METHODIK | 9 |
| | 2.1. Der AMES-Test | 9 |
| | 2.1.1. Labortechnische Arbeit mit den Testerstämmen | 11 |
| | 2.1.2. Nährböden und Lösungen | 13 |
| | 2.1.3. Testsubstanzen | 15 |
| | 2.1.4. Testkontrollen | 15 |
| | 2.1.5. Testablauf | 16 |
| | 2.1.6. Testauswertung | 18 |
| | 2.1.7. Chemikalien, Materialien und Geräte | 21 |
| | 2.2. Untersuchungsmaterial | 22 |
| 3. | ERGEBNISSE | 23 |
| | 3.1. Patienten mit Harnblasenkarzinom | 23 |
| | 3.2. Phenacetinabuser | 32 |
| | 3.3. Cyclophosphamid-Gruppe | 36 |
| | 3.4. Ifosphamid-Gruppe | 40 |
| | 3.5. Vergleichende Betrachtung | 43 |
| 4. | DISKUSSION | 47 |
| | 4.1. Diskussion der Ergebnisse | 47 |
| | 4.2. Kritik des AMES-Tests | 50 |
| | 4.3. Einordnung des Tests und Ausblick | 52 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 54 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 55 |

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms

Tumoren der Harnblase stellen ca. 0,5 % aller Tumoren des Menschen, wobei etwa 3,2 % aller Krebstodesfälle zu Lasten des Blasenkarzinoms gehen. Zu 90 - 95 % handelt es sich um epitheliale Tumoren, der Rest ist mesenchymalen Ursprungs.
Epidemiologische Studien bzw. die Berufskrebsforschung gaben schon vor Jahrzehnten Hinweise auf eindeutige exogene Ursachen des Harnblasenkarzinoms. Hierbei zeigte insbesondere die berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen vom Typ des 2-Naphthylamins, des Benzidins und des 4-Aminobiphenyls erhöhte Erkrankungsrisiken. Die älteste und bekannteste Publikation zu diesem Thema stammt von Rehn 1895 (83).
Die in den vergangenen zwanzig Jahren beobachtete Zunahme der Harnblasenkarzinommorbidität in den hochindustrialisierten Ländern gibt weiterhin Anlaß, die Gründe dafür in einer verstärkten Belastung mit Karzinogenen zu suchen (90). Im Verdacht stehen hier insbesondere organische Chemikalien.
In der Dritten Welt spielt das Harnblasenkarzinom demgegenüber eine untergeordnete Rolle, wenn man von den Gebieten absieht, in denen die Bilharziose endemisch ist. Häufige Folge dieser Erkrankung sind Plattenepithelkarzinome der Harnblase, während in den Industrienationen dieser Tumortyp gegenüber dem Urothelkarzinom (95 % der Fälle) weit in den Hintergrund tritt.
Der beruflich bedingte Anteil der Harnblasenkarzinomfälle wird für Männer auf 25 - 30 % (6,24) und für Frauen auf 10 % (24) geschätzt. Bemerkenswert sind die Latenzzeiten, die sich zwischen 18 - 45 Jahren bewegen (22, 85, 25).
Signifikant häufiger fand sich das Harnblasenkarzinom bei Arbeitern in der Farbstoff- und Chemikalienherstellung, bei der Herstellung von Pigmenten und Anstrichmitteln, in der Gummiindustrie, der Kabelfertigung, in Textilfärbereien, der Lederverarbeitung, der Steinkohlenteerindustrie und bei Gasarbeitern (95). Auch Tätigkeiten in der Petroleum- und

Kunststoffindustrie (75) sowie Öl- und Benzinexposition (70, 71) werden mit der Induktion von Harnblasenkarzinomen in Zusammenhang gebracht. Thériault et al. nennen Zusammenhänge zwischen Harnblasenkarzinom und Aluminiumexposition. Offensichtlich stellt die Tätigkeit als Aluminiumschmelzer ein hohes Risiko dar, wobei polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe den ursächlichen Faktor darstellen sollen (94).
Als weitere gesicherte Ursache für Harnwegstumoren muß das Rauchen von Zigaretten angesehen werden (26, 24, 69, 99). Gleichzeitig besteht eine gesicherte Korrelation zwischen dem Auftreten von Lungen- und Harnblasenkarzinomen (90). So werden Harnblasentumoren cirka zehn Jahre nach dem Lungentumor, falls dieser so lange überlebt wird, diagnostiziert (23). Durch das Rauchen werden ca. 33 % der Urotheltumoren verursacht (26).
Ein überadditiver, eventuell sogar ein multiplikativer Effekt wird für das Zusammenwirken von Rauchen und beruflicher Karzinogenexposition postuliert (20, 21, 96).
In der Gruppe der iatrogen verursachten Urotheltumoren nehmen das Phenacetin und seine Metaboliten eine bedeutende Stellung ein (45, 65). Phenacetinabuser zeigen nicht nur eine stark erhöhte Inzidenz von Nierenbecken- und Harnleiterkarzinomen sondern, nach jüngeren Erkenntnissen, vor allem auch von Harnblasenkarzinomen. Die mittlere Tumorinduktionszeit beträgt hier für das Harnblasenkarzinom 28 Jahre.
Als gesichert gilt auch das - bis um den Faktor 45 höhere - Risiko, nach Cyclophosphamidtherapie an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken (35, 52). Analoges wird für Imidazolderivate, die als Radiosensitizer verwendet werden, sowie für Ifosphamid, ein dem Cyclophosphamid verwandtes Zytostatikum, beschrieben (44).
Hinzu kommen Opiumderivate (59) und Süßstoffe, die - zumindest experimentell - als Kokarzinogen gelten (41, 48, 49, 72).
In der Diskussion stehen Zusammenhänge mit endogener Tryptophanentstehung (40), Kaffeekonsum (43, 49, 60, 64, 73,

98), hohem Nitratgehalt im Trinkwasser (93) und Chlorierung des Trinkwassers (19, 29).
Diese Aufzählung darf jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß ein Großteil (nach Kunze (56) ca. 80 %) der Harnblasenkarzinome ätiologisch nicht geklärt sind. Dies legt die Vermutung einer komplexen Urothelkarzinogenese nahe. Vieles spricht dafür, "daß die Mehrzahl der Harnblasentumoren nicht durch ein allein wirksames potentes Karzinogen, sondern durch die synergistische Wirkung mehrerer, unterschiedlich zu bewertender kausaler Faktoren im Sinne einer multifaktoriellen Mehrstufenkarzinogenese induziert wird" (56). In diesem Zusammenhang sei auf einen wesentlichen Faktor, nämlich den "individuellen Gesundheitszustand" hingewiesen. Dieser schwer zu beschreibende "Zustand", der durch genetische sowie Ernährungsfaktoren beeinflußt wird, bestimmt mit die Empfänglichkeit für umweltbedingte Karzinome (18). Vor allem das Vorhandensein und Zusammenspiel bzw. die unterschiedliche Verteilung bestimmter Enzymaktivitäten haben Anteil an der Entstehung umweltinduzierter Tumoren (86). Norpoth (77) beschreibt exemplarisch die für die Harnblasenkarzinomgenese wichtigen Stoffwechselwege der aromatischen Amine.

## 1.2. Präventive Onkologie

Das Ziel letztlich aller epidemiologischer Studien ist es, Hinweise auf Stoffe, Stoffklassen oder Gemische von Stoffen zu erhalten, die dann mit Hilfe von labortechnischen und mikrobiologischen Methoden oder im Tierversuch analysiert und auf ihre karzinogene Potenz untersucht werden können. Nach dieser Vorgehensweise ist eine Vielzahl von Stoffen als Karzinogen gesichert, wie z. B. einige der erwähnten aromatischen Amine, Benzo(a)pyren und Aflatoxin. Hierzu zählen auch die Nitrosamine (54), die auch endogen entstehen können (33). Bekannt sind erhöhte Nitrosaminwerte bei der Achlorhydrie des Magens und bei der Bilharziose der

Harnblase (47), beides Erkrankungen, nach denen überdurchschnittlich häufig Karzinome des Magens bzw. der Harnblase beobachtet werden.
Bei der Vielzahl der in der Industriegesellschaft verwandten Chemikalien ergibt sich für die präventive Onkologie die Notwendigkeit, Techniken zur Erfassung karzinogen wirkender Substanzen zu entwickeln und somit die Möglichkeit zu schaffen, für deren Eliminierung aus der Umwelt zu sorgen.
Wenn man die Tumorentstehung als komplexen, mehrstufigen Vorgang sieht, bei dem auch geringe Mengen von Karzinogenen evtl. im Zusammenwirken mit "Krebspromotoren" (97) zur Auslösung eines Tumors ausreichen, dann ist es notwendig, auch schwache Karzinogene zu erfassen.
Bei der herkömmlichen Methode der Karzinogentestung im Tierversuch ergeben sich gravierende Probleme. Um statistisch gesicherte Ergebnisse zu erhalten, sind große Versuchstierzahlen erforderlich; bei einigen Tumoren ist mit sehr langen Latenzzeiten zu rechnen; der finanzielle und personelle Aufwand für solche Untersuchungen ist enorm.

### 1.2.1. In-vitro-Testverfahren

Dem Ziel, schnelle und statistisch einwandfreie Aussagen über die karzinogene Wirkung einer Substanz zu erhalten, dienten in jüngster Zeit entwickelte in-vitro-Testverfahren, die im wesentlichen Zell- und Bakterienkulturen verwenden. Wichtigste Aufgabe dieser Testverfahren sind: die Erfassung des letztlich wirksamen Karzinogens in Gemischen mit karzinogener Wirkung, die Aufklärung karzinogener Mechanismen und die Identifizierung karzinogener Metaboliten. Eine Übersicht über derzeit gebräuchliche Testverfahren und bisherige Anwendungsbereiche geben die Tabellen 1 und 2.

Tab. 1: Labormethoden zur Erfassung mutagener bzw. karzinogener Substanzen

| |
|---|
| Nicht-metabolisierende Testsysteme |
| 1. Bakterienkulturen |
| 2. Lymphozytenkulturen |
| 3. Fibroblasten, Hamsterembryonen u. a. |
| Metabolisierende Testsysteme |
| 1. "Dominant lethal"-Test |
| 2. Zytogenetische Methoden (Knochenmark- oder Mikronukleolus-Test) |
| 3. Host mediated assay |
| 4. In-vitro-Systeme: |
| a) Säugetierzellen + Feeder cells |
| b) Bakterien + Lebermikrosomen |
| 5. Zelltransformation (Peritonealzelltest) |
| 6. Drosophila melanogaster (X-linked recessive lethals) |
| 7. Mammalian spot test |

Tab. 2: Bisherige Anwendungsbereiche von Mutagenitätstests

| |
|---|
| 1. Aufspüren von Karzinogenen/Mutagenen in komplexen Mischungen von Stoffen der Umwelt |
| 2. Prüfung neuer Verbindungen |
| 3. Aufklärung der Mechanismen chemischer Krebsinduktion |
| 4. Überwachung der Mutagenexposition des Menschen durch Testung von Körperflüssigkeiten |

Viele dieser Testverfahren sind in der Lage, primäre, d. h. unmittelbar wirkende, ebenso wie sekundäre Karzinogene zu erfassen; sekundäre Karzinogene entfalten ihre Wirkung erst nach metabolischer Umwandlung beispielsweise in der Leber

(Abb. 1). Diese Umwandlung wird in einigen Testverfahren durch eine metabolisierende Komponente, wie z. B. mikrosomale Leberenzyme, nachvollzogen.

Bei den genannten Testsystemen wird im eigentlichen Sinne die mutagene Wirkung von Karzinogenen erfaßt, d. h. die Veränderung des genetischen Materials. Die Übereinstimmung von Mutagenitätsnachweis und Karzinogenität liegt zwischen 80 und 90 % (34, 81). Dies bedeutet: bis zu 90 % der als karzinogen klassifizierten Substanzen wirken, z. B. im AMES-Test, mutagen.
Man muß sich darüber im klaren sein, daß die angeführten Tests jeweils nur bestimmte Mutationen erfassen, die unter Umständen sehr spezifisch sein können (81) und deshalb bei verschiedenen Stoffklassen zu unterschiedlich hohen Trefferquoten führen. Aus diesen Darlegungen folgt, daß momentan in-vitro Mutagenitätstests sinnvoll miteinander kombiniert ihre Bedeutung im Screening von Verbindungen und Metaboliten haben. Hier ermöglichen sie die Auswahl von Substanzen, die dann Langzeit-Karzinogenitätstests unterworfen werden.

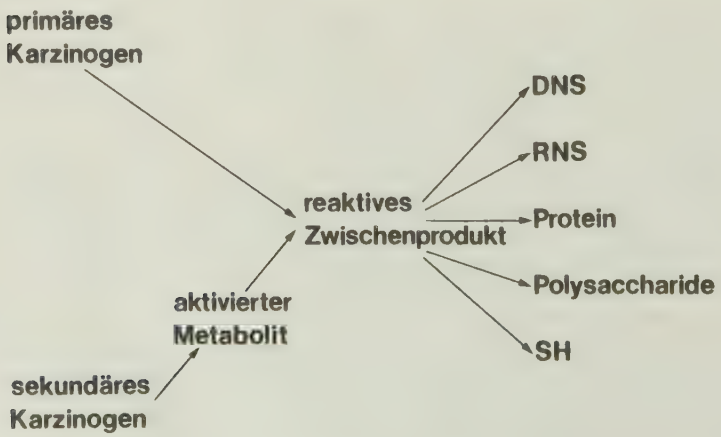


Abb. 1: Wirkungsprinzip von primären und sekundären Karzinogenen

### 1.2.2. Mutagenitätsnachweis im Urin

Auch zur Untersuchung von Körperflüssigkeiten, wie Blut und Urin, wurden die in-vitro Mutagenitätstests herangezogen. Für die Aufklärung der Harnblasenkarzinomgenese ergab sich aus der Untersuchung des Urins auf mutagene Substanzen ein weiterer Zugangsweg.
McCann und Ames (61) wiesen bereits 1975 Derivate von N-Acetylaminofluoren als Mutagene im Rattenurin nach. Fong (32) fand mutagenen Urin bei Ratten, die eine Salzfisch-Diät erhalten hatten. Des weiteren wurden Mutagene im Harn von Ratten nachgewiesen, die mit aromatischen Aminen (12, 13), Aflatoxin (91), Amaranth (74), Praziquantel (79) oder INH (66) behandelt worden waren. Gleiches gilt für Urin von Mäusen, die Metronidazol (27) erhalten hatten. Mutagene Aktivität im Hundeharn wurde nachgewiesen nach Gaben des Glukuronsäurekonjugates von N-Hydroxy-4-amino-biphenyl sowie von 2-Formylamin-4-(5)-nitro-2-furylthiazol (FANFT) (39, 46).
Bereits 1977 fanden Yamasaki und Ames deutlich erhöhte mutagene Aktivitäten im Harn von Rauchern. Nachgewiesen wurden mutagene Aktivitäten im Urin von Arbeitern der Gummiindustrie (30), von Personen, welche vorübergehend der Einwirkung von Epichlorhydrin ausgesetzt worden waren (53), von Krankenschwestern, welche Zytostatika zu verabreichen hatten (11, 31), sowie von Anästhesisten (63). Keine Mutagenität fand sich im Harn von Frauen, die Haarfärbemittel benutzten (16). Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von Albano (2) und Ammenheuser (5), die im Urin von mit Haarfärbemitteln behandelten Ratten mutagene Aktivitäten nachweisen konnten.
Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt an Arbeitern bei der Kohleelektrodenherstellung (82), bei beruflichem Kontakt mit Mineralölen und Eisenoxydpartikeln (57, 87), bei Raffinerie- (50) und Kokereiarbeitern (55). Selbst Passivraucher lassen sich offensichtlich von Kontrollkollektiven unterscheiden (10). Garner (37) untersuchte den Urin von

Harnblasenkarzinompatienten und fand eine Beziehung zwischen Mutagennachweis und Harnblasentumor, die in der Gruppe der Nichtraucher signifikant war. Ob sich generell erhöhte mutagene Aktivitäten im Harn von Harnblasenkarzinompatienten finden, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der klinischen Anwendung des von AMES, B. N. et al. (3) 1975 entwickelten bakteriellen Mutagenitätstests zur Aufspürung mutagener Aktivitäten.

## 2. MATERIAL und METHODIK

### 2.1. Der AMES-Test

Der AMES-Test verwendet durch Genmanipulation entwickelte Histidin-abhängige Mutanten von Salmonella typhimurium $LT_2$, die bei Anwesenheit eines Mutagens in den Histidin-unabhängig wachsenden Wildtyp rückmutieren (revertieren). Dementsprechend wachsen diese sogenannten Revertanten auf Histidin-freien Nährböden zu makroskopisch zählbaren Kolonien aus, während die Zuchtmutanten im Histidin-freien Medium kein Wachstum zeigen. Abbildung 2 zeigt das Konzept dieses Tests im Schema.

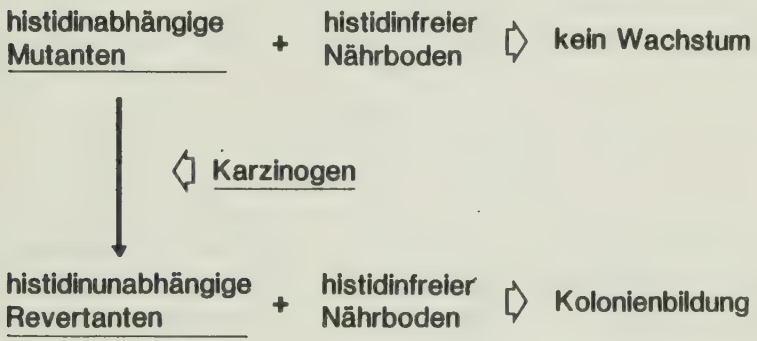


Abb. 2: Grundlagen des bakteriellen Mutagenesetests

Die Testerstämme wurden hinsichtlich Spezifität und Sensitivität selektioniert. Zum einen unterscheiden sie sich in der Art der vorliegenden Mutation, die zur Histidin-Abhängigkeit geführt hat, und damit in der Revertierbarkeit durch Substanzen mit verschiedenem Wirkungsmechanismus. Zum anderen sind sie so "konstruiert", daß die Aufnahme der Testsubstanz durch die Bakterienmembran und deren mutagene Wirksamkeit verstärkt werden. Durch zwei zusätzliche Mutationen wird dies bewirkt: Die eine führt zu einem fehler-

haften "Ausschneide-Reparatursystem", d. h. einmal eingetretene Mutationen werden bei weiteren Zellteilungen nicht mehr repariert und dadurch manifestiert.
Die andere Mutation hat den Verlust der bakterieneigenen Lipopolysaccharidbarriere zur Folge. Dies erleichtert vielen Substanzen die Penetration durch die Zellmembran. Zwei Stämme enthalten außerdem einen sogenannten R-Faktor (resistance transfer factor). Dabei handelt es sich um ein zusätzliches Stück DNA (Plasmid), das die Bakterien gegen das Antibiotikum Ampicillin resistent macht. Die Resistenz ist verbunden mit einer zusätzlichen Empfindlichkeit gegenüber vielen Mutagenen.

Verwendet wurden die Stämme, die für Screening-Untersuchungen empfohlen werden. Es waren dies: TA 98, TA 100, TA 1535 und TA 1537. Tabelle 3 zeigt die dazugehörigen Mutationen und ihre Genorte (3).

Tab. 3: Genorte der Mutationen bei den TA-Stämmen, die zur Mutagenitätstestung verwendet werden (nach AMES et al.). Erläuterungen siehe Text

| Histidin-Mutation | | | Zusätzliche Mutationen | | |
|---|---|---|---|---|---|
| his G 46 | his C 3076 | his D 3052 | LPS | Reparatur | R Faktor |
| TA 1535 | TA 1537 | TA 1538 | rfa | ΔuvrB* | - |
| TA 100 | | TA 98 | rfa | ΔuvrB* | +R |

* Die Empfindlichkeit gegen UV-B-Licht (Δ) geht mit dem Fehlen der Nitrat-Reduktase- und Biotin-Gene einher.

TA 100 und TA 1535 werden durch solche Mutagene rückmutiert, die Basenpaarsubstitutionen verursachen (z. B. alkylierende Substanzen), TA 98 und TA 1537 durch solche, die Rasterverschiebungen auslösen (z. b. 9-Aminoacridin). Um sekundäre Karzinogene zu erfassen, kann der Test mit einer Imitation der Leberpassage durchgeführt werden. Hierzu dient ein bei 9000 g zentrifugiertes Ratten-Leberhomogenat - die

S-9-Fraktion-, die zusammen mit Kofaktoren den sogenannten "S-9-Mix" bildet. Eine vorherige Leberenzyminduktion durch Gabe von Arochlor 1254 ist dafür zu empfehlen.
Auf diese metabolisierende Komponente wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung verzichtet, da für die Fragestellung bezüglich der Harnblasenkarzinomgenese die Wirkung von Karzinogenen auf das Urothel von primärem Interesse ist. Es wurde von der Annahme ausgegangen, daß die meisten urothelwirksamen Karzinogene schon in ihrer aktiven Form im Urin vorliegen und nicht erst metabolisiert werden müssen.

2.1.1. Labortechnische Arbeit mit den Testerstämmen

Die Stämme wurden von der Firma Byk-Gulden Konstanz als Schrägagarkulturen zur Verfügung gestellt. Diese wurden monatlich auf neuen Schrägagar überimpft und im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Parallel dazu wurden die Stämme monatlich auf ihre biologischen Eigenschaften überprüft:

a) Histidin-Biotin Bedarf
Auf Minimalagarplatten mit und ohne Histidin-Biotin Lösung (0,2 ml mit der Pipette steril aufgebracht und mit dem Glasspatel verteilt) wurden die Stämme von der Schrägagarkultur mit der Platinöse ausgestrichen. Die beimpften Platten wurden 24 h bei 37°C bebrütet. Die Platten ohne Histidin-Biotin dürfen kein Wachstum aufweisen, während die Platten mit Histidin-Biotin gutes Wachstum zeigen müssen.

b) Prüfung des starken Rauh-Charakters (rfa-Mutation)
Die Stämme wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Kristallviolett (oder Desoxycholat) geprüft.
Ein steriles Filterpapierplättchen, das 0,01 ml einer 1 mg/ml Kristallviolettlösung (48 h über Phosphorpentoxyd im Exxiccator getrocknet) enthält, wurde auf eine Nähragarplatte gelegt und mit einem dünnen Ober-

schichtagar, der 0,1 ml (ca. $10^8$ Bakterien) der Ausgangskultur aus der Nährbouillon enthält, überschichtet. Die andere Hälfte der Platte wurde zur Prüfung der Ampicillinresistenz (siehe unten) verwandt. Nach 12 h Bebrütung bei 37°C zeigte eine wachstumsfreie Zone (ca. 14 mm Durchmesser) die Anwesenheit der starken Rauhfaktor-(rfa)Mutation an.

c) Prüfung auf Anwesenheit eines Widerstandsfaktors gegen Ampicillin

Die Prüfung ist bei den Stämmen TA 98 und TA 100 erforderlich, die dieses Plasmid enthalten.
Auf die freie Hälfte der Platten, die zur Prüfung der Empfindlichkeit gegen Kristallviolett benutzt wurden, wurde je ein Ampicillin Testplättchen aufgelegt (getrocknete mit 8 mg Ampicillin/ml $H_2O$ getränkte Filterpapierplättchen).
Im gleichen Arbeitsgang zusammen mit den Kristallviolett-Testplättchen (s. o.) wurde dann mit Oberschichtagar, der 0,1 ml der Bakterienausgangskultur enthält, überschichtet.
Nur um die Stämme TA 1535 und TA 1537 darf sich ein Hemmhof entwickeln.

d) Die Prüfung der UV-Empfindlichkeit (uvrB-Mutation), die als ziemlich stabile Eigenschaft gilt, wurde aufgrund fehlender technischer Voraussetzungen nicht vorgenommen.

Von den oben erwähnten Schrägagar-Vorratskulturen wurden wöchentlich Kulturen auf Nähragar in Petrischalen angelegt. Aus diesen Kulturen wurde die Bouillon für den Test beimpft. Die Petrischalenkulturen wurden im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt.
Für den Test beimpft man je 10 ml Nährbouillon im Reagenzglas, das für maximal 16 h ins 37°C Schüttelwasserbad gestellt wird. Die Bouillonkultur kann für einige Tage im Kühlschrank vorrätig gehalten werden.

## 2.1.2. Nährböden und Lösungen

a) Unterschichtagar

Die Petrischalen (94 mm Ø) enthalten ca. 25 ml eines Minimal-Glucose-Mediums. Wir verwandten dazu 1,5 % Bacto-Difco-Agar in Vogel-Bonner Minimal Medium mit 2 % Glucose. Die Platten können mehrere Wochen bei Zimmertemperatur gelagert werden. Zum Test sollten sie mindestens 8 - 10 Tage alt sein.

Vogel-Bonner Minimal Medium (5-fach):

In ca. 6 l aqua dest. werden nacheinander gelöst

| | |
|---|---|
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 10,00 g |
| Zitronensäure | 100,00 g |
| $K_2HPO_4$ wasserfrei | 500,00 g |
| $NaNH_4HPO_4 \times 4H_2O$ | 175,00 g |

Mit aqua dest. wird auf das Endvolumen von 10 l aufgefüllt. Das Medium wird autoklaviert und in 5-facher Stärke vorrätig gehalten. Zur Agarherstellung muß es 1 : 5 mit aqua dest. verdünnt werden.

Zu 2500 ml Medium werden 1,5 % Agar (37,5 g) gegeben und im Agarmaten autoklaviert (End-pH ca. 7). Zu dem verflüssigten Agar wird vor dem Plattengiessen 2-prozentige sterile Glukoselösung (200 ml) in den Agarmaten gegeben. Nach Abkühlung auf 50°C werden die Petrischalen mit ca. 25 ml Agar/Platte möglichst blasenfrei beschickt. Zum Trocknen und zur Sterilitätsprüfung werden die Platten zwei Tage bei 37°C bebrütet.

b) Oberschichtagar

Der Oberschichtagar besteht aus 0,6 prozentigem Bacto-Difco Agar und 0,5 % NaCl (6 g Agar + 5 g NaCl in 1000 ml aqua dest.). Er wird nach dem Autoklavieren in Portionen von 100 ml in Erlenmeyerkolben im Kühlschrank vorrätig gehalten (End-pH 7 $\pm$ 0,2).

c) Nähragar (Komplettagar für die Stammhaltung)

| | |
|---|---|
| Bacto-Difco Agar | 15,00 g |
| Bacto-Nutrient-Broth | 8,00 g |
| NaCl | 5,00 g |
| aqua dest. | 1000,00 ml |

wird im Agarmaten 20 min bei 120°C autoklaviert. Zur Herstellung von Schrägagar werden 5 ml Portionen in sterile Reagenzgläser abgefüllt und bis zum Erkalten schräg gelagert. In Petrischalen werden ca. 25 ml Agar abgefüllt. Zum Trocknen und zur Sterilitätsprüfung werden Petrischalen und Reagenzgläser zwei Tage bei 37°C bebrütet.

d) Nährbouillon

| | |
|---|---|
| Bacto-Nutrient-Broth | 8,00 g |
| NaCl | 5,00 g |
| aqua dest. | 1000,00 ml |

lösen und 20 min bei 120°C autoklavieren. Aufbewahrung in sterilen Gefäßen bei +4°C.

e) Phosphat-Puffer pH 7,4 (0,2 molar)

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ | 35,60 g |
| aqua dest. | 1000,00 ml |

Mit 1n HCl wird pH 7,4 eingestellt (ca. 1,4 ml 1 n HCl auf 40 ml Puffer). Der Puffer wird für den Test ohne S-9-Mix 1 : 2 verdünnt, autoklaviert und in sterilen Gefäßen vorrätig gehalten.

f) Histidin-Biotin Vorratslösung (0,5 mmol in 600 ml)

0,05 mmol l-Histidin = 46,548 mg in 300 ml aqua dest.
+0,5 mmol Biotin = 73,293 mg in 300 ml aqua dest.
(Biotin mit einigen Tropfen 1n NaOH vollständig lösen)
Der pH-Wert der Lösung liegt bei 7. Die Mischung wird sterilfiltriert, für den Vorrat in Portionen von je 100 ml abgefüllt und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.3. Testsubstanzen

Verwendet wurde 24 h-Sammelurin, der nach der Sammelperiode 10 : 1 ankonzentriert[1] und dann im Gefrierschrank bei -18°C aufbewahrt wurde. Am Testtag wurde der Urin bei Zimmertemperatur aufgetaut und anschließend sterilfiltriert. Danach wurden folgende Verdünnungen mit sterilem aqua dest. angelegt:

1. 1 : 100 ≙ 1 µl konz. Urin/0,1 ml Testzusatz
2. 1 : 10 ≙ 10 µl konz. Urin/0,1 ml Testzusatz
3. 1 : 5 ≙ 20 µl konz. Urin/0,1 ml Testzusatz
4. 1 : 2 ≙ 50 µl konz. Urin/0,1 ml Testzusatz
5. 1 : 1 ≙ 100 µl konz. Urin/0,1 ml Testzusatz

Dem Test wurden somit den Verdünnungen entsprechend jeweils 0,01 ml; 0,1 ml; 0,2 ml; 0,5 ml und 1 ml Normalurin zugegeben.

2.1.4. Testkontrollen

a) Kontrolle mit bekannt positiven Substanzen

Bekannt positiv reagierende Substanzen wurden zur Prüfung der Sensitivität der Bakterienstämme bei jedem Test mitgeführt. Es waren dies:

- 4-Nitro-ortho-phenylendiamin 50 µg/0,1 ml Testzusatz, für die Stämme TA 98, TA 100 und TA 1537
- 2-Formylamin-4-(5)-nitro-2-furylthiazol (FANFT) 0,2 µg/0,1 ml Testzusatz, für TA 98 und TA 100
- 9-Aminoacridin 50 µg/0,1 ml Testzusatz, für TA 1537
- Streptozotocin 10 µg/0,1 ml Testzusatz, für TA 1535

Alle positiven Substanzen waren in sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

b) Kontrolle der Spontanmutantenrate

Bei jedem Test wurde die Spontanmutantenrate der einzelnen Stämme mitbestimmt, indem anstelle der Testsubstanz dem Testansatz 0,1 ml aqua dest. beigegeben wurde.

[1] AMICON Hohlfaser Konzentrierungs/Entsalzungssystem Typ DC 2A

Die Spontanmutantenrate beträgt nach Literaturangaben für die Stämme:

| | |
|---|---|
| TA 98 | 30 - 50 Kolonien/Platte |
| TA 100 | 120 - 200 Kolonien/Platte |
| TA 1535 | 10 - 35 Kolonien/Platte |
| TA 1537 | 3 - 15 Kolonien/Platte |

c) Sterilkontrollen

Zur Überprüfung der Sterilität wurden bei jedem Test Platten mitgeführt, die jeweils 0,1 ml der Urinverdünnungen sowie aqua dest. ohne Zusatz der Testerstämme enthielten. Die Positivkontrollen wurden stichprobenartig auf Sterilität geprüft.

2.1.5. Testablauf

Die Urinverdünnungen, die Kontrollsubstanzen, sowie die Sterilkontrollen wurden in doppeltem Ansatz in Versuch genommen. Die Bestimmung der Spontanmutantenrate erfolgte pro Stamm mit je vier Platten. Für einen Test waren somit 82 Minimalagarplatten notwendig. Die Platten wurden auf dem Dekkel- jeder Stamm mit einer anderen Farbe - beschriftet. Der Boden der Petrischale durfte wegen der späteren Auszählung der Kolonien mit dem Zählautomaten nicht beschriftet werden.

Im siedenden Wasserbad wurden 200 ml Oberschichtagar verflüssigt und nach Abkühlung auf 45°C mit 20 ml Histidin-Biotin Lösung versetzt, unter Umschwenken gut gemischt und in ein Wasserbad von 45°C gestellt. Für jede Testplatte wurde ein kleines Reagenzröhrchen mit 2 ml Oberschichtagar benötigt. In diesem Wasserbad befanden sich also 82 sterile Plastikreagenzröhrchen mit Plastikkappe, in die sodann je 2 ml Oberschichtagar mit steriler Glaspipette und Pipettierhilfe gegeben wurden.

Die Reagenzröhrchen wurden nacheinander dem Wasserbad entnommen. Jedem Röhrchen wurden 0,5 ml Phosphatpuffer (mit

Eppendorfpipette, sterile Spitze), 0,1 ml Testsubstanz (mit Eppendorfpipette, pro Substanzverdünnung eine neue sterile Spitze) und anschließend 0,1 ml Bakterienbouillonkultur (mit steriler Glaspipette und Pipettierhilfe) zugegeben. Der Inhalt des Röhrchens wurde auf einem Mixer kurz gemischt und dann auf den Unterschichtagar gegossen. Der Plattendeckel wurde sofort wieder aufgelegt und der erkaltende Oberschichtagar durch Drehen der Schale im Kreis möglichst ohne Blasen gleichmäßig verteilt. Der gesamte Vorgang sollte in 20 Sekunden abgeschlossen sein. Bei Erstarrung der Mischung wurden die Platten mit dem Boden nach oben umgedreht. Zugegeben wurde immer ein Bakterienstamm, beginnend mit den Spontanmutantenplatten, dann von der niedrigsten zur höchsten Konzentration aufsteigend, zum Schluß die Kontrollsubstanzen. Danach war der nächste Stamm an der Reihe. Zum Abschluß des Tests wurden die Sterilkontrollen angelegt.
Die erstarrten Platten wurden im dunklen Brutschrank 48 h bei 37°C bebrütet.
Eine schematische Darstellung des Tests zeigt Abbildung 3.

Der Test erfordert optimal sterile Bedingungen. Glaswaren und Papierstopfen wurden hitze-, wiederverwendbare Kunststoffartikel Ethylenoxid-sterilisiert. Einmalartikel waren steril verpackt.
Die Arbeit mit infektiösem Material und mit mutagenen Substanzen hatte unter höchster Sorgfalt zu erfolgen, um jegliche Kontamination über die Haut (Handschuhe), durch Inhalation oder per os (Mundschutz) zu vermeiden. Der Arbeitsplatz wurde mit einer saugfähigen Einmalpapierabdeckung ausgelegt.
Glaswaren, die mit infektiösem Material kontaminiert waren, wurden vor dem Spülen hitzesterilisiert. Mutagene Substanzen kamen nur mit Einmalartikeln in Berührung, um eine ordnungsgemäße Beseitigung zu gewährleisten.
Das Einmalmaterial wurde getrennt nach infektiösem und mutagenem Müll in Plastiksäcken gesammelt. Der mutagene Abfall wurde als Sondermüll verbrannt, der infektiöse durch Autoklavieren unschädlich gemacht.

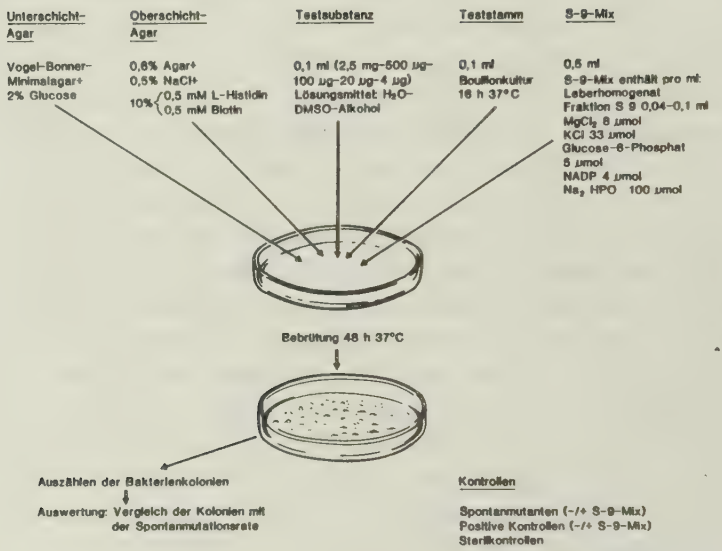


Abb. 3: Schematische Darstellung des Salmonella typhimurium Mutagenese-Tests (Modifikationen siehe Text)

### 2.1.6. Testauswertung

Nach 48 h Bebrütung war auf den Platten ein sehr feiner Hintergrundrasen von Bakterienkolonien sichtbar. Die Spur l-Histidin und Biotin erlaubt im Überschichtagar ein zartes Koloniewachstum. Dies ist wichtig für die Mutagenese. In vielen Fällen kann ohne diesen Hintergrundrasen keine Mutation der Bakterien durch eine mutagene Substanz stattfinden.

Toxische Einflüsse lassen sich anhand einer Hemmung des Hintergrundrasens erkennen, während sich die Revertantenkolonien deutlich als einzelstehende Kolonien vom Hintergrundrasen abheben (Abb. 4).

Die Auszählung der Revertantenkolonien wurde mit einem videokontrollierten, automatischen Kolonienzählgerät (Biotran III) durchgeführt und auf einem Bogen protokolliert (Abb. 5).

Die Ergebnisse der ausgezählten Platten wurden in einen programmierbaren Rechner eingegeben. Es wurden die Mittelwerte der Leerkontrollen, sowie der fünf Urinkonzentrationen berechnet. Mit Hilfe des Jonckhere-Verfahrens wurde das Vorliegen einer Dosisabhängigkeit geprüft.

Abb. 4: Petrischalen mit deutlich sichtbaren Revertanten-Kolonien

Schließlich vergleicht der Rechner,ob irgend ein Mittelwert der Testkonzentrationen den doppelten Mittelwert der jeweiligen Leerkontrolle übersteigt.

Jonckheres verteilungsfreie Rangvarianzanalyse ist nach Norpoth et al. (78) das angemessene Verfahren, um Dosis-Wirkungs-Beziehungen im AMES-Test statistisch zu bewerten. Die Methode ist relativ einfach. Beim Vergleich der Einzelwerte einer Konzentration mit den Einzelwerten der darunterliegenden Konzentration werden Rangsummen gebildet, die dann mit

Hilfe der Jonckhere-Tabellen beurteilt werden können und Aussagen auf verschiedenen Signifikanzniveaus erlauben.
In der Anlage ist das Rechnerprogramm zur Testauswertung wiedergegeben.

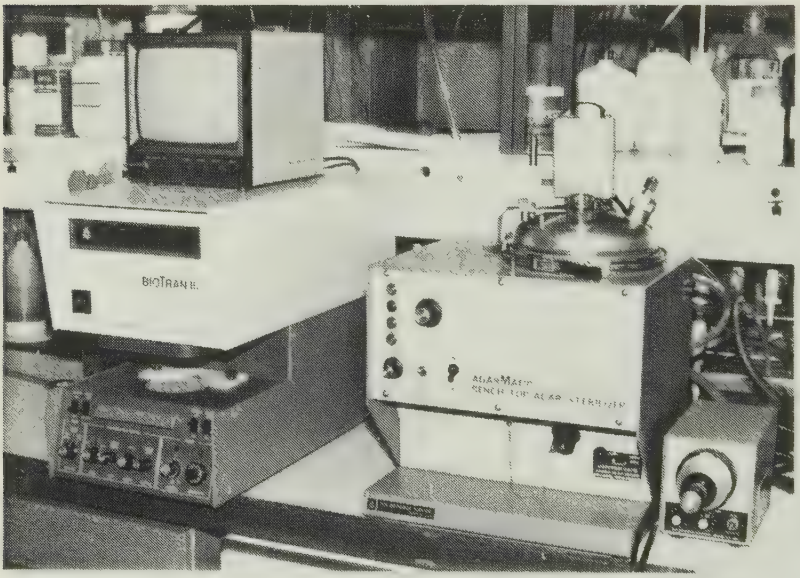


Abb. 5: Laborarbeitsplatz mit Koloniezählgerät (links) und Agarsterilisator (rechts)

Allgemein gilt zur Beurteilung des AMES-Tests, daß eine Substanz dann als mutagen anzusehen ist, wenn die Revertantenrate mindestens die doppelte Spontanmutantenrate erreicht und eine Dosiswirkung zu erkennen ist.
Diskutiert wird jedoch, ob mit dieser Begrenzung auf die doppelte Spontanmutantenrate nicht schwache Mutagene übersehen werden, d. h. daß der Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der Betrachtung schwacher Mutagene ein größerer Stellenwert eingeräumt werden sollte als der absoluten Revertantenzahl (62, 78).

## 2.1.7. Chemikalien, Materialien und Geräte

Nicht erwähnt sind Chemikalien und Gegenstände, die zur üblichen klinischen Laborausstattung gehören, wie z. B. pH-Meter, Schüttelmixer, Standardchemikalien, Glaswaren und Eppendorf-Pipetten.

a) Chemikalien

Die im Test erwähnten Chemikalien kamen von der Fa. Merck, Darmstadt, BRD, ausgenommen die nachfolgend aufgeführten:

Bacto Agar "Difco" certified, Nr. 0140-01
Bacto Nutrient Broth, Nr. 0003-01-6
Herst.: Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Ampicillin (Binotal$^{R}$)
Herst.: Bayer, Leverkusen, BRD

Steriles aqua dest. (Ampuwa$^{R}$)

Herst.: Fresenius AG, Bad Homburg, BRD

b) Materialien und Geräte

Petrischalten 94/16 mm ohne Nocken, Nr. 632 171
Polypropylen -Reagenzröhrchen mit Spezialstopfen, 5 ml, Nr. 115 261
Herst.: Greiner, Nürtingen, BRD

Einweg Filtrationsvorsatz SM 165 27
mit Sartorius Membranfilter SM 111 07 Porengröße 0,2 µm
mit Sartorius Membranfilter SM 111 06 Porengröße 0,45 µm
Dreiringspritze 50 ml SM 166 22
Herst.: Sartorius, Göttingen, BRD

Pipettierhelfer Pumpett 18 Mikro
Herst.: B. Braun, Melsungen, BRD

Automatisches Koloniezählgerät Biotran III
Agarmatic Bench-top Agarsterilisator
Dosierpumpe zum Agarsterilisator
Herst.: New Brunswick Scientific, Edison N. J., USA

## 2.2. Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden Urinproben von am Harnblasenkarzinom der Stadien $T_A$ - $T_4$ ($G_O$ - $G_3$) erkrankten Patienten (n = 33). Das Alter der Patienten lag zwischen 48 und 84 Jahren (Ø = 69,85 Jahre), das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 5,6 : 1.
Bei 5 Patienten wurden Urinproben von zwei verschiedenen Tagen untersucht.

Weiterhin wurden Urinproben von 7 Personen (4 Frauen, 3 Männer) mit bekanntem Phenacetinabusus getestet. Ihr Alter lag zwischen 26 und 64 Jahren (Ø = 48 Jahre).
Hier wurden bei einer Person Urinproben von zwei verschiedenen Tagen untersucht.

Während der Urinsammelperiode wurde darauf geachtet, daß die Patienten möglichst keine Medikamente zu sich nahmen. Des Weiteren wurden Urinproben von Personen, die mit Cyclophosphamid oder Ifosphamid (bei verschiedenen Diagnosen) therapiert wurden, im AMES-Test bearbeitet. Bei diesen Personengruppen war es jedoch nicht möglich, die Begleitmedikation abzusetzen. Teilweise wurden weitere Zytostatika kombiniert verabreicht.

Die Cyclophosphamidgruppe bestand aus 6 Personen (4 Männer, 2 Frauen) im Alter zwischen 10 und 59 Jahren (Ø = 37 Jahre). Bei einer Person wurden Urinproben von zwei verschiedenen Tagen untersucht.

Die Ifosphamidgruppe setzte sich aus 5 Männern von 16 bis 53 Jahren (Ø = 37,2 Jahre) zusammen. Ifosphamid wurde bei allen Patienten kombiniert mit Uromitexan$^R$ (zur Urotheloprotektion) verabreicht.

Die Urinproben wurden in ungeordneter Reihenfolge in der oben beschriebenen Weise untersucht.

## 3. ERGEBNISSE

Die Stämme TA 98 und TA 1537 zeigten im Verlauf der Untersuchung jeweils nur einmal mutagene Aktivität an. Demgegenüber reagierten die Stämme TA 100 und vor allem TA 1535 wesentlich empfindlicher. Aus diesem Grund werden in den folgenden Darstellungen diese beiden Stämme berücksichtigt.
Bezüglich der Patienten, von denen zwei Urinproben untersucht wurden, wurde für die Beurteilung der Gesamtgruppe jeweils nur die erste Probe in die Auswertung aufgenommen.

Die Spontanmutantenrate schwankte bei den einzelnen Stämmen zwischen folgenden Werten:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TA 98 | 14,75 | - | 47,00 | bei einem Mittelwert von | 23,95 |
| TA 100 | 63,50 | - | 241,75 | bei einem Mittelwert von | 153,44 |
| TA 1535 | 11,00 | - | 84,50 | bei einem Mittelwert von | 44,50 |
| TA 1537 | 3,00 | - | 15,00 | bei einem Mittelwert von | 7,42 |

### 3.1. Patienten mit Harnblasenkarzinom

Die Tabellen 4 und 5 zeigen die absoluten Ergebnisse in Koloniezahlen/Platte für jeden der 33 untersuchten Patienten.

Bei den mit dem Stamm TA 1535 inkubierten Proben verhinderten toxische Einflüsse in vier Fällen die Beurteilung. Eine weitere Probe zeigte trotz toxischer Erscheinungen in den höchsten Konzentrationen bereits bei den niedrigen Konzentrationen deutlich erhöhte Revertantenzahlen. Diese Probe wurde deshalb in der Quotientenauswertung, nicht aber bei der Dosis-Wirkungs-Berechnung berücksichtigt (s. u.).
Von den somit verbliebenen 29 Proben ergaben sich nach dem obigen Kriterium (Q = Revertantenrate/Spontanmutantenrate 2) in 14 Proben Anzeichen für mutagene Aktivitäten bei einem 99 %-Konfidenzintervall für die Dosis-Wirkungs-Beziehung. Das entspricht einem Anteil von 48,3 %.

Tab. 4: Harnblasenkarzinompatienten (n=33; 38 Urinproben): Anzahl Kolonien/Platte bei TA 1535

a) 99,9% Dosis-Wirkungs-Beziehung
b) 99% Dosis-Wirkungs-Beziehung
c) keine Dosis-Wirkungs-Beziehung

| | Patient | Spontan. | 0,01 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 | ml Urinvolumen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a) | B | 39,50 | 56,5 | 61,0 | 65,0 | 119,0 | 130,0 | x |
| | D | 39,50 | 51,5 | 54,5 | 53,0 | 86,5 | 97,5 | x |
| | G | 54,75 | 58,0 | 79,5 | 107,0 | 168,0 | 187,5 | x |
| | K | 38,00 | 35,5 | 52,0 | 77,0 | 98,0 | 158,0 | x |
| | MA | 71,75 | 65,0 | 76,5 | 89,5 | 125,5 | 142,0 | |
| | MB | 23,25 | 26,0 | 26,5 | 36,5 | 35,0 | 65,0 | x |
| | MC | 31,00 | 41,5 | 36,0 | 51,0 | 74,5 | 78,0 | x |
| | R | 58,00 | 58,0 | 70,5 | 81,5 | 99,5 | 132,0 | x |
| | SA | 41,25 | 50,5 | 60,0 | 57,5 | 103,0 | 178,5 | x |
| | SB | 21,75 | 20,0 | 22,0 | 33,5 | 53,5 | 60,0 | x |
| | S1 | 54,75 | 61,0 | 66,0 | 86,0 | 105,0 | 132,0 | x |
| | (BA | 41,25 | 46,0 | 88,5 | 171,0 | tox. | tox. ) | x |
| | F2 | 16,75 | 20,5 | 37,5 | 58,5 | 110,0 | 214,5 | (x) |
| | R2 | 43,75 | 51,5 | 60,0 | 73,0 | 99,5 | 215,5 | (x) |
| | S2 | 45,75 | 62,5 | 63,0 | 63,0 | 138,5 | 194,5 | (x) |
| b) | KA | 70,00 | 65,0 | 77,5 | 86,0 | 99,0 | 87,5 | |
| | K1 | 53,00 | 53,0 | 72,5 | 64,5 | 102,0 | 100,5 | |
| | MD | 43,25 | 48,0 | 63,5 | 59,5 | 95,5 | 135,0 | x |
| | R1 | 43,75 | 46,0 | 40,0 | 62,0 | 68,5 | 90,5 | x |
| | T | 33,75 | 28,0 | 32,5 | 42,5 | 38,0 | 59,5 | |
| | WA | 29,75 | 33,0 | 29,0 | 31,0 | 54,5 | 61,0 | x |
| | W1 | 61,75 | 69,5 | 72,0 | 78,5 | 78,5 | 100,5 | |
| c) | A | 45,75 | 29,5 | 43,5 | 50,0 | 37,5 | 56,0 | |
| | AA | 11,00 | 11,5 | 12,5 | 14,5 | 13,0 | 14,0 | |
| | C | 29,75 | 25,0 | 43,5 | 38,5 | 33,0 | 38,0 | |
| | DA | 82,00 | 99,0 | 92,5 | 86,5 | 105,0 | 118,5 | |
| | F1 | 57,50 | 57,5 | 54,5 | 59,0 | 67,0 | 69,0 | |
| | H | 43,50 | 31,0 | 49,5 | 42,5 | 52,5 | 74,0 | |
| | KB | 19,50 | 21,0 | 15,5 | 22,0 | 23,5 | 30,5 | |
| | ME | 57,50 | 50,5 | 50,5 | 55,0 | 62,5 | 72,0 | |
| | SC | 35,00 | 31,0 | 34,5 | 44,5 | 38,5 | 56,0 | |
| | SD | 27,00 | 19,0 | 25,5 | 28,5 | 34,0 | 34,5 | |
| | (E | 39,50 | 45,0 | 52,0 | 51,0 | 71,0 | tox. ) | |
| | (HA | 63,75 | 51,0 | 44,5 | tox. | tox. | tox. ) | |
| | (SE | 58,00 | 65,5 | tox. | tox. | tox. | tox. ) | |
| | (WB | 49,50 | 45,5 | 55,0 | 38,5 | 51,0 | tox. ) | |
| | K2 | 24,00 | 20,0 | 20,5 | 25,0 | 20,0 | 38,0 | |
| | W2 | 26,25 | 33,0 | 30,0 | 27,5 | 39,0 | 32,0 | |

Erläuterung siehe Tabelle 6.

Tab. 5: Harnblasenkarzinompatienten (n=33; 38 Urinproben): Anzahl Kolonien/Platte bei TA 100

a) 99,9% Dosis-Wirkungs-Beziehung
b) 99% Dosis-Wirkungs-Beziehung
c) keine Dosis-Wirkungs-Beziehung

| | Patient | Spontan. | 0,01 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 | ml Urinvolumen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a) | F1 | 160,75 | 159,5 | 167,0 | 174,0 | 195,0 | 211,0 | |
| | G | 146,25 | 161,5 | 185,0 | 189,0 | 288,0 | 414,0 | x |
| | HA | 157,25 | 149,5 | 170,0 | 183,5 | 219,5 | 246,5 | |
| | K | 171,00 | 165,5 | 224,5 | 228,5 | 300,5 | 332,5 | |
| | MB | 63,50 | 60,5 | 81,0 | 84,5 | 111,5 | 136,5 | x |
| | SB | 174,75 | 180,0 | 204,0 | 194,5 | 246,0 | 334,0 | |
| | S1 | 146,25 | 157,0 | 175,0 | 180,0 | 170,5 | 341,5 | x |
| | (BA | 174,75 | 167,5 | 260,0 | 327,0 | tox. | tox. ) | |
| | F2 | 146,25 | 134,5 | 178,0 | 188,0 | 294,5 | 402,5 | (x) |
| | K2 | 125,75 | 165,0 | 214,5 | 418,5 | 752,0 | 892,5 | (x) |
| b) | AA | 91,25 | 109,0 | 101,5 | 113,5 | 121,5 | 131,5 | |
| | B | 157,50 | 151,5 | 188,0 | 184,0 | 195,0 | 287,5 | |
| | H | 182,25 | 163,0 | 169,5 | 198,5 | 217,5 | 231,5 | |
| | KB | 146,25 | 168,5 | 168,0 | 187,5 | 177,5 | 202,5 | |
| | K1 | 157,00 | 157,0 | 169,0 | 197,0 | 219,5 | 257,0 | |
| | ME | 160,75 | 169,5 | 167,5 | 168,0 | 199,5 | 220,5 | |
| | SC | 160,75 | 179,0 | 171,5 | 173,5 | 194,5 | 196,5 | |
| | WA | 118,75 | 131,0 | 128,0 | 163,0 | 176,0 | 178,0 | |
| | R2 | 154,00 | 178,0 | 175,0 | 184,5 | 202,5 | 323,0 | (x) |
| | S2 | 103,00 | 135,0 | 157,5 | 138,5 | 169,0 | 284,0 | (x) |
| c) | A | 103,00 | 121,0 | 128,0 | 132,5 | 122,5 | 122,0 | |
| | C | 118,75 | 150,0 | 140,0 | 107,5 | 137,0 | 199,5 | |
| | D | 157,50 | 136,0 | 128,0 | 150,0 | 176,0 | 180,0 | |
| | DA | 158,50 | 160,5 | 178,0 | 165,5 | 178,0 | 172,0 | |
| | KA | 139,25 | 133,0 | 159,0 | 153,5 | 168,0 | 148,0 | |
| | MA | 151,75 | 131,0 | 143,5 | 175,0 | 182,0 | 211,5 | |
| | MD | 177,75 | 152,0 | 132,0 | 217,5 | 237,0 | 193,0 | |
| | R | 171,00 | 160,5 | 175,5 | 161,5 | 187,5 | 217,5 | |
| | R1 | 156,00 | 179,5 | 174,0 | 180,0 | 171,0 | 259,0 | |
| | SA | 158,50 | 189,5 | 179,5 | 186,5 | 191,0 | 185,0 | |
| | SD | 106,25 | 102,5 | 100,5 | 110,5 | 100,0 | 102,0 | |
| | SE | 171,00 | 162,0 | 201,0 | 181,5 | 202,5 | 221,5 | |
| | T | 118,75 | 170,0 | 152,5 | 151,0 | 151,0 | 163,0 | |
| | W1 | 149,25 | 176,5 | 162,0 | 151,0 | 176,0 | 191,5 | |
| | (E | 157,50 | 151,0 | 142,0 | 155,5 | tox. | tox. ) | |
| | (MC | 171,00 | 171,0 | 180,5 | 172,5 | 176,5 | tox. ) | |
| | (WB | 176,00 | 171,5 | 176,5 | 167,5 | 169,0 | tox. ) | |
| | W2 | 128,00 | 123,5 | 129,5 | 118,0 | 119,0 | 156,5 | |

Erläuterung siehe Tabelle 6.

Beim Stamm TA 100 wurden vier Proben wegen toxischer Erscheinungen in den höchsten Konzentrationen von der Beurteilung ausgenommen.
Hier ergab sich ein Mutagenitätsnachweis in drei Fällen. Das entspricht einem Anteil von 10,3 %. Diese drei Proben wurden auch mit TA 1535 erkannt.

Wie aus den Tabellen weiter zu entnehmen ist, wurde, um genauere Aussagen zu erhalten, eine Aufteilung der Harnblasenkarzinomgruppe nach der Dosis-Wirkungs-Beziehung des Revertantenwachstums vorgenommen. Daraus ergaben sich markante Unterschiede der Mutagenitätsquotienten in den einzelnen Untergruppen. Es wurden jeweils drei Gruppen, eine mit 99,9 % (I), eine mit 99,0 % (II) und eine ohne Dosis-Wirkungs-Beziehung (III) gebildet.

Für den Stamm TA 1535 ergab sich in der Gruppe I mit elf Patienten (= 39,3 %) ein in der Nähe von 3 liegender Mutagenitätsquotient. In der Gruppe II mit sieben Patienten (= 25 %) lag der Quotient knapp unter 2, während er für die Gruppe III mit zehn Patienten (= 35,7 %) bei 1,38 lag. Die Abbildungen 6a - c zeigen die Kurvenverläufe jedes Patienten innerhalb der einzelnen Gruppen sowie die Mittelwerte der Gruppen.
Die Summe der Patienten ergibt hier nur 28, da für eine Probe wegen toxischer Einflüsse keine Zuordnung zu den Gruppen möglich war (s. o.).

Beim Stamm TA 100 ergaben sich für die Gruppe I mit sieben Patienten (= 24,1 %) Werte um 2. Die Gruppe II mit acht Patienten (= 27,6 %) hatte einen durchschnittlichen Quotienten von 1,46 und die Gruppe III mit vierzehn Patienten (= 48,3 %) zeigte ein Mittel von 1,26.
Die Abbildungen 7a - c zeigen die entsprechenden Kurvenverläufe für den Stamm TA 100.

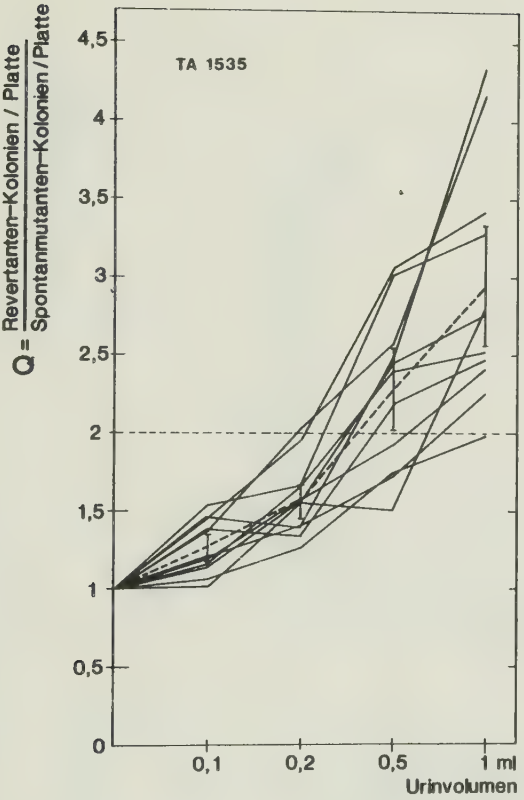


Abb. 6a: Harnblasenkarzinompatienten (n = 11): Gruppe mit 99,9 % D-W-Beziehung bei TA 1535.
Quotientenbetrachtung: Einzelwerte ————
Mittelwert --------

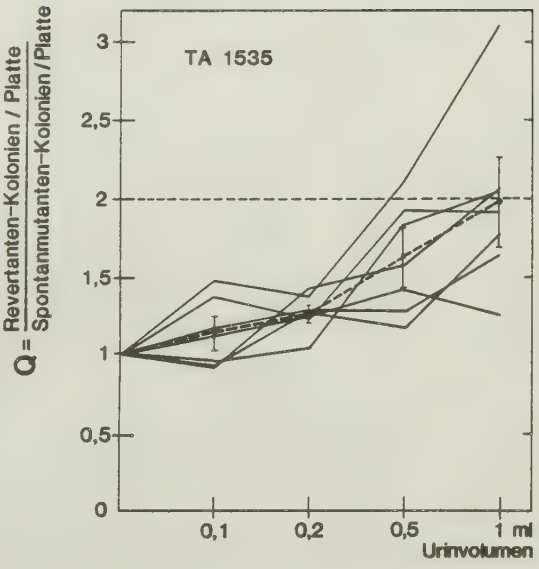


Abb. 6b:
Harnblasenkarzinompatienten (n=7): Gruppe mit 99 % D-W-Beziehung bei TA 1535.
Quotientenbetrachtung: Einzelwerte ———
Mittelwert -----

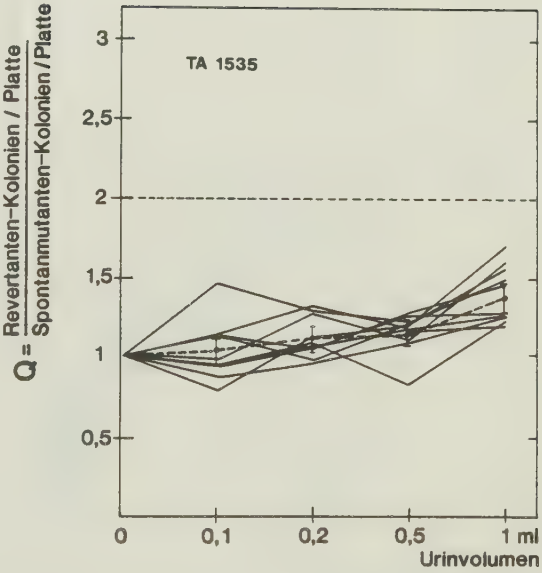


Abb. 6c:
Harnblasenkarzinompatienten (n=10): Gruppe ohne D-W-Beziehung bei TA 1535.
Quotientenbetrachtung: Einzelwerte ———
Mittelwert -----

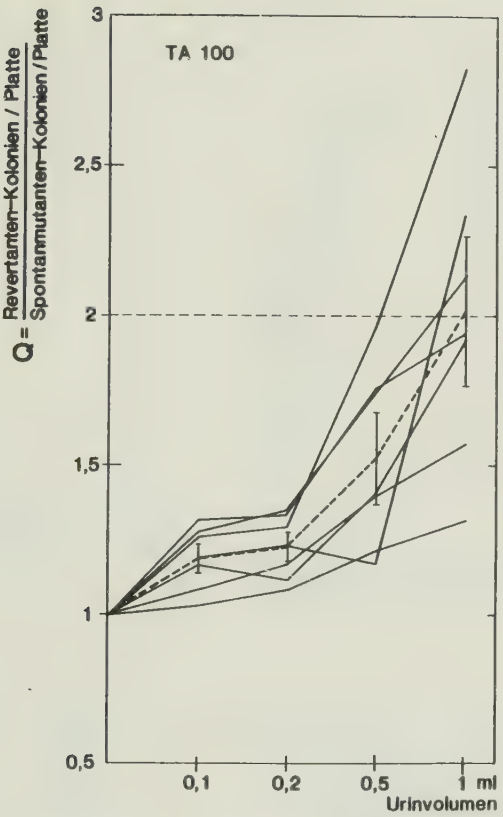


Abb. 7a: Harnblasenkarzinompatienten (n=7): Gruppe mit 99,9 D-W-Beziehung bei TA 100.
Quotientenbetrachtung: Einzelwerte ———
Mittelwert - - - - -

Die Abbildungen 8a und 8b stellen die Kurvenverläufe von fünf Patienten, von denen je zwei Urinproben untersucht wurden, dar. Die Indizes 1 und 2 (siehe Tabellen und Abbildungen) bedeuten die vom Sammeldatum abhängige 1. und 2. Probe.
Ein Patient zeigte sowohl in der ersten als auch in der zweiten Probe keinen Hinweis auf mutagene Aktivität.

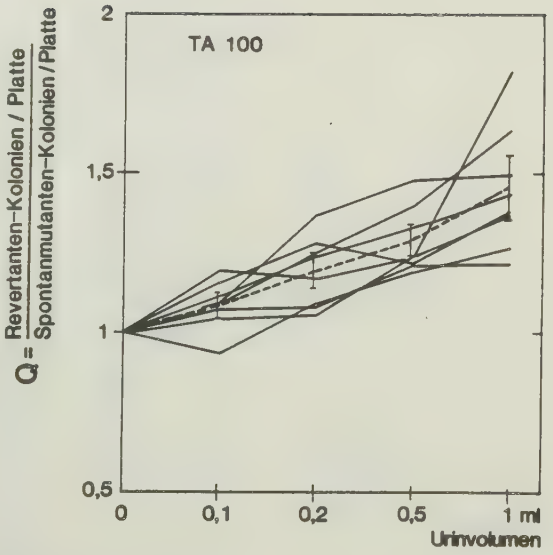


Abb. 7b:
Harnblasenkarzinompatienten (n=8): Gruppe mit 99 % D-W-Beziehung bei TA 100.
Quotientenbetrachtung: Einzelwerte ———
Mittelwert -----

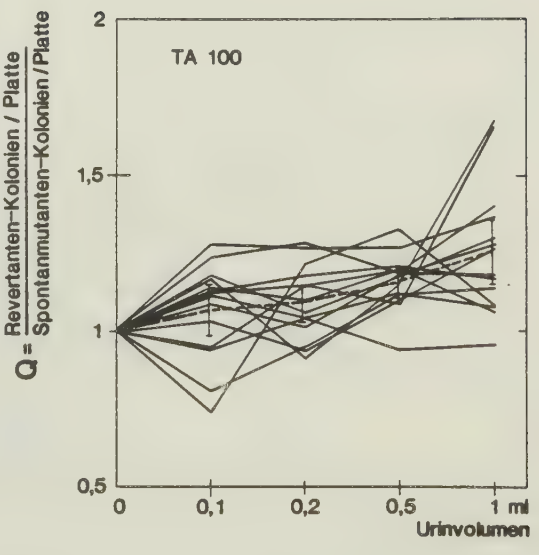


Abb. 7c:
Harnblasenkarzinompatienten (n=14): Gruppe ohne D-W-Beziehung bei TA 100.
Quotientenbetrachtung: Einzelwerte ———
Mittelwert -----

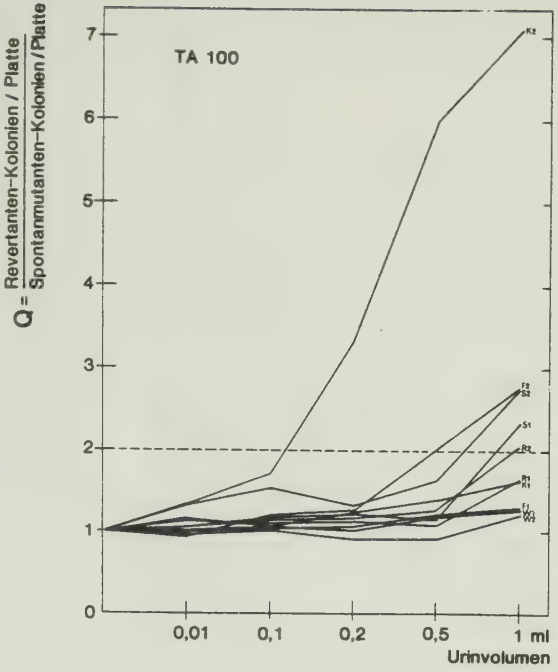


Abb. 8a + b:
Harnblasenkarzinompatienten (n=4), von denen je zwei Urinproben untersucht wurden.
a: bei TA 100; b: bei TA 1535
Quotientenbetrachtung; Erläuterung siehe Text

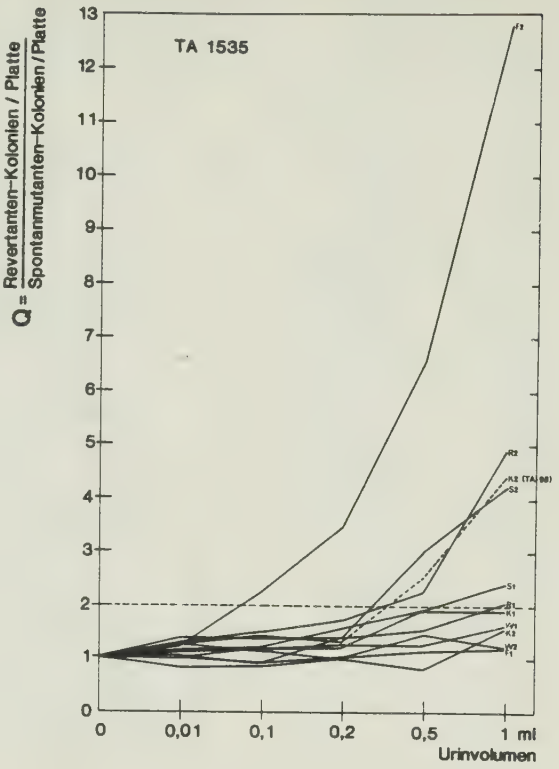


Abb. 8b:

Von den verbleibenden vier Patienten hatten zwei in der ersten Probe einen positiven Befund für TA 1535, einer von den zweien auch für TA 100. Die restlichen ersten Proben waren negativ, während die zweiten Proben aller vier Patienten mutagene Werte beim Stamm TA 100 ergaben, bei dreien auch der Stamm TA 1535 stark positiv reagierte und einmal TA 98 Mutagenität anzeigte. Hier fiel jedoch TA 1535 negativ aus.

## 3.2. Phenacetinabuser

Wie aus Tabelle 6 zu entnehmen ist, wurden 8 Urinproben von sieben Patienten mit bekanntem Phenacetinabusus untersucht. Für den Stamm TA 1535 waren 7 Urinproben von sechs Patienten auswertbar, da eine Probe aus Toxizitätsgründen wegfiel. Zwei Patienten (= 33,3 %) hatten deutliche mutagene Aktivitäten bei gegebener Dosis-Wirkungs-Beziehung. Bei beiden Patienten zeigte auch TA 100 die höchsten Revertantenzahlen. Bei diesem Stamm konnten alle Proben ausgewertet werden. Auch hier reagierte TA 100 weniger ausgeprägt. Eine Urinprobe wurde als mutagen eingestuft, eine Probe lag mit der Revertantenzahl bei höchster Urinkonzentration nur knapp unter der doppelten Spontanmutantenrate. Beide Proben zeigten eine 99,9 %-ige Dosis-Wirkungs-Beziehung im Gegensatz zu den restlichen Proben, die ein negatives Ergebnis aufwiesen.
Bei einer Person, bei der bereits TA 1535 positiv und TA 100 grenzwertig reagierte, ergab sich für den Stamm TA 1537 nur einmal in der gesamten Untersuchung der Nachweis einer mutagenen Aktivität.
Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Ergebnisse der Phenacetinabuser im einzelnen.

Bei einer Patientin wurden zwei Urinproben, die an zwei aufeinanderfolgenden Tagen gesammelt worden waren, untersucht. Beide Male konnte kein Mutagennachweis geführt werden; es

ergaben sich nur ein Mal bei TA 1535 und ein Mal bei TA 100 99 %-ige Dosis-Wirkungs-Beziehungen, allerdings ohne wesentlichen Anstieg der Revertantenzahl (siehe Tab. 6, Abb. 9 und 10).

Tab. 6: Phenacetinabuser (n=7 ; 8 Urinproben):
Anzahl Kolonien/Platte

a) 99,9 % Dosis-Wirkungs-Beziehung
b) 99 % Dosis-Wirkungs-Beziehung
c) keine Dosis-Wirkungs-Beziehung

| Patient | Spontan. | 0,01 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 | ml Urinvolumen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bei TA 1535 | | | | | | | |
| a) H | 34,25 | 34,5 | 38,0 | 44,5 | 98,5 | 118,5 | x |
| b) R1 | 43,75 | 51,0 | 47,5 | 48,5 | 57,0 | 62,5 | |
| S | 41,25 | 51,0 | 41,5 | 68,5 | 72,0 | 98,0 | x |
| c) HA | 43,50 | 38,0 | 46,5 | 40,0 | 53,5 | 82,0 | |
| SA | 71,75 | 77,0 | 69,0 | 78,5 | 43,5 | 36,5 | |
| W | 49,00 | 64,0 | 44,5 | 64,5 | 58,5 | 29,0 | |
| (K | 43,50 | 44,5 | tox. | tox. | tox. | tox.) | |
| R2 | 27,00 | 24,0 | 20,5 | 30,0 | 19,0 | 31,5 | |
| Bei TA 100 | | | | | | | |
| a) H | 241,75 | 225,5 | 251,0 | 300,0 | 320,0 | 530,5 | x |
| S | 174,75 | 133,5 | 194,5 | 203,0 | 273,5 | 320,5 | |
| b) R2 | 156,00 | 157,0 | 177,5 | 153,0 | 195,0 | 211,0 | |
| c) HA | 182,25 | 168,5 | 188,0 | 181,0 | 175,5 | 234,5 | |
| K | 182,25 | 173,5 | 174,5 | 171,0 | 175,0 | 141,0 | |
| R1 | 156,00 | 154,0 | 146,0 | 171,0 | 185,0 | 186,0 | |
| SA | 151,75 | 164,0 | 162,5 | 153,5 | 154,5 | 162,0 | |
| W | 160,75 | 189,5 | 186,0 | 156,0 | 182,5 | 181,5 | |

Erläuterung: Die aufgeführten Werte sind Mittelwerte aus je 2 Einzelbestimmungen bei jeder Urinkonzentration bzw. aus je 4 Bestimmungen bei den Spontanmutantenplatten (= Spontan.).
x = die doppelte Spontanmutantenrate wird überschritten.
()= in der graphischen Darstellung nicht berücksichtigt.

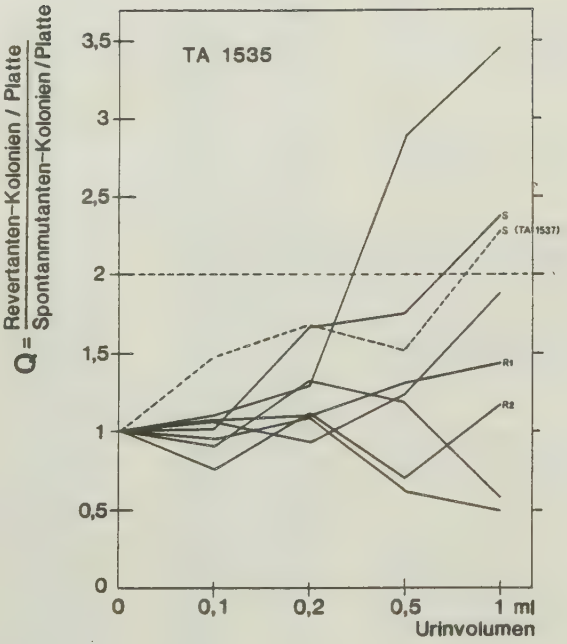


Abb. 9a:
Phenacetinabuser (n=6): Quotientenbetrachtung der Einzelwerte bei TA 1535.
----- = TA 1537 (siehe Text)

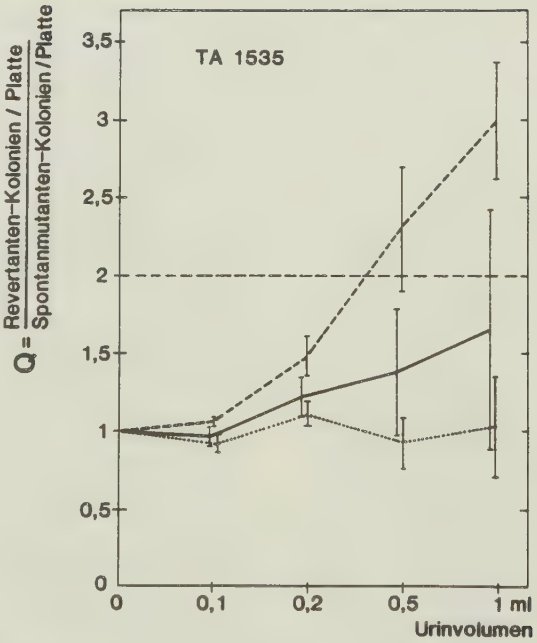


Abb. 9b:
Phenacetinabuser (n=6): Quotientenbetrachtung der Mittelwerte bei TA 1535.
Gruppe mit Q > 2 (n=2) -----; Gruppe mit Q < 2 (n=4) .....; gesamt ———

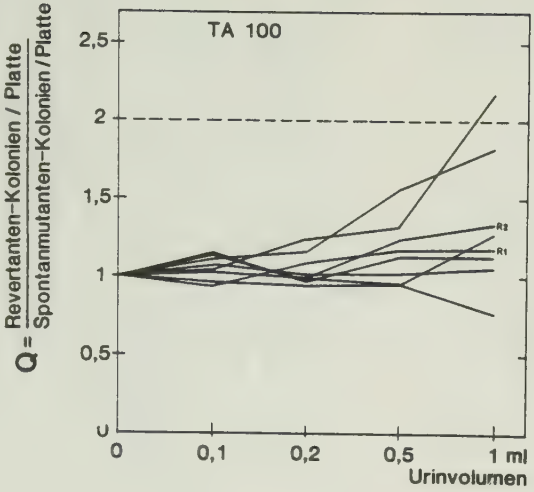


Abb. 10a:
Phenacetinabuser (n=7): Quotientenbetrachtung der Einzelwerte bei TA 100.

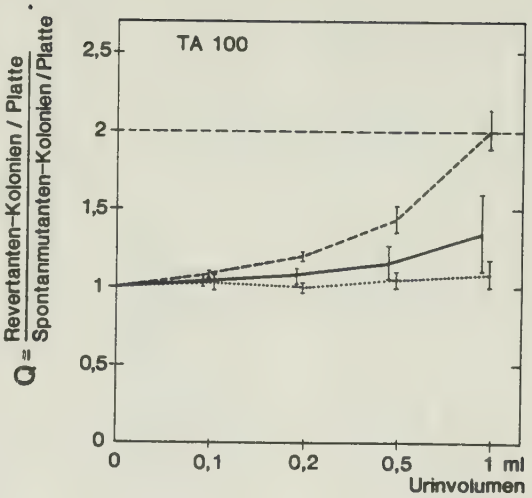


Abb. 10b:
Phenacetinabuser (n=7): Quotientenbetrachtung der Mittelwerte bei TA 100. Gruppe mit 99,9 % D-W-B. (n=2) ----; Restgruppe (n=5) ....; gesamt ———

### 3.3. Cyclophosphamid-Gruppe

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, wurden 7 Urinproben von sechs Patienten untersucht. Die Patienten wurden mit unterschiedlichen Dosen von Cyclophosphamid sowohl oral als auch parenteral behandelt. Eine Probe war für alle Stämme toxisch und wurde daher nicht berücksichtigt. Eine weitere Probe war in der höchsten Konzentration für alle Stämme toxisch, jedoch mit Hilfe der niedrigeren Konzentrationen eindeutig auswertbar.

Tab. 7: Cyclophosphamid-Gruppe (n=6; 7 Urinproben): Anzahl Kolonien/Platte

a) 99,9 % Dosis-Wirkungs-Beziehung
b) 99 % Dosis-Wirkungs-Beziehung
c) keine Dosis-Wirkungs-Beziehung

| Patient | Spontan. | 0,01 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 | ml Urinvolumen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bei TA 1535 | | | | | | | |
| a) B | 29,25 | 52,5 | 87,5 | 142,5 | 213,0 | 319,5 | x |
| G | 13,50 | 20,5 | 27,5 | 29,5 | 74,0 | 116,0 | x |
| R | 82,00 | 89,5 | 122,0 | 131,5 | 212,5 | 217,5 | x |
| S | 43,25 | 66,0 | 67,5 | 91,0 | 107,0 | tox. | x |
| W1 | 43,75 | 49,5 | 48,0 | 69,0 | 75,5 | 130,5 | x |
| W2 | 61,75 | 64,0 | 67,0 | 86,5 | 123,5 | 125,0 | (x) |
| (BA | 53,00 | 58,5 | 70,0 | tox. | tox. | tox. | |
| Bei TA 100 | | | | | | | |
| a) B | 145,75 | 135,0 | 199,5 | 287,5 | 354,0 | 454,0 | x |
| G | 122,00 | 120,0 | 140,5 | 151,0 | 157,5 | 199,0 | |
| b) R | 158,50 | 163,0 | 208,0 | 159,5 | 278,5 | 321,5 | x |
| W1 | 156,00 | 161,5 | 156,5 | 198,0 | 215,5 | 214,0 | |
| W2 | 149,25 | 172,5 | 176,0 | 176,0 | 195,5 | 257,0 | |
| c) S | 177,75 | 152,0 | 163,5 | 151,0 | 169,5 | tox. | |
| (BA | 157,00 | 175,5 | 148,0 | tox. | tox. | tox.) | |

Erläuterung siehe Tabelle 6.

Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, zeigte der Stamm TA 1535 auch hier die größte Empfindlichkeit und wies in allen sechs Proben mutagene Aktivität nach.

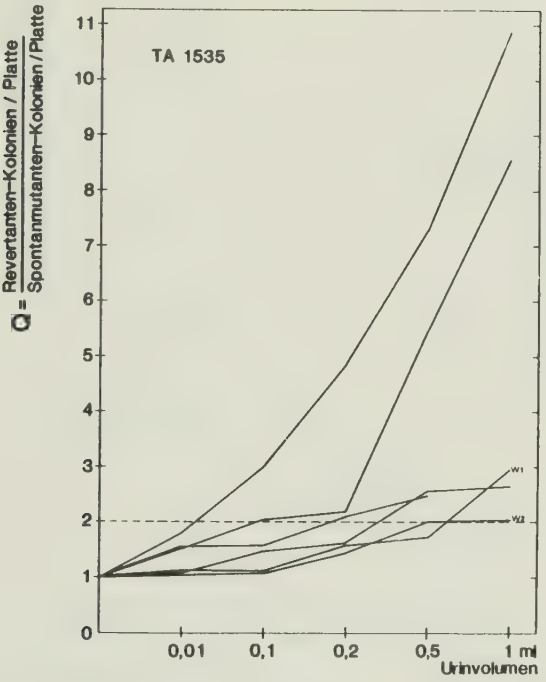


Abb. 11: Cyclophosphamid-Gruppe (n=5): Quotientenbetrachtung der Einzelwerte bei TA 1535.
(bei 1 Patient toxisch für die höchste Konzentration)

Besonders hohe Aktivitäten ergaben sich bei zwei Patienten, die beide zusätzliche Zytostatikamedikationen erhalten hatten, der Eine Vincristin mit Adriblastin, der Andere Vincristin mit Natulan. In diesen zwei Fällen wurden jedoch auch hohe Dosen Cyclophosphamid verabreicht.
Von einem Patienten wurden zwei Proben untersucht, wobei die eine Probe zwei Tage nach der ersten gesammelt wurde. Bei der ersten wurde zusätzlich zu Cyclophosphamid Adri-

blastin verabreicht, bei der zweiten nur Cyclophosphamid. Die Probe mit Adriblastin ergab höhere Revertantenwerte. Für den Stamm TA 100 ließ sich dies nicht in der gleichen Weise zeigen (Abb. 11 und 12).

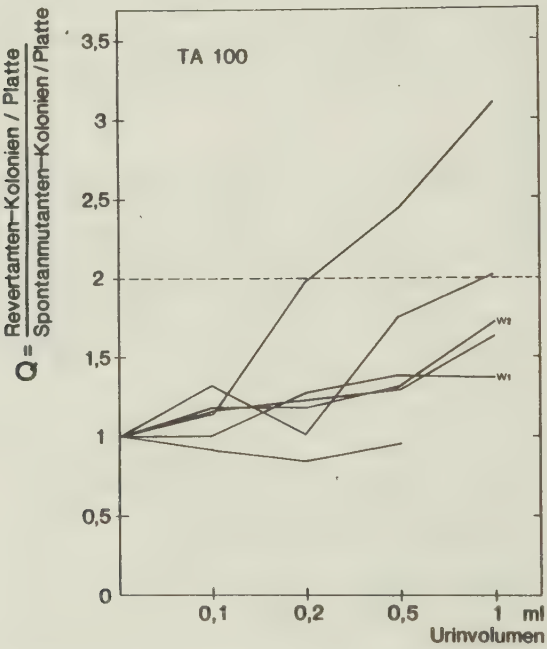


Abb. 12: Cyclophosphamid-Gruppe (n=5): Quotientenbetrachtung der Einzelwerte bei TA 100.
(bei einem Patienten toxisch für die höchste Konzentration)

TA 100 reagierte insgesamt weniger empfindlich und ergab nur in zwei Fällen den Nachweis mutagener Aktivitäten nach den o. g. Kriterien. Bei zwei weiteren Patienten war eine mäßige, bei einem Patienten keine Erhöhung der Revertantenzahlen zu verzeichnen (Abb. 12). Die Mittelwerte der untersuchten Gruppe sind den Abbildungen 13 und 14 zu entnehmen.

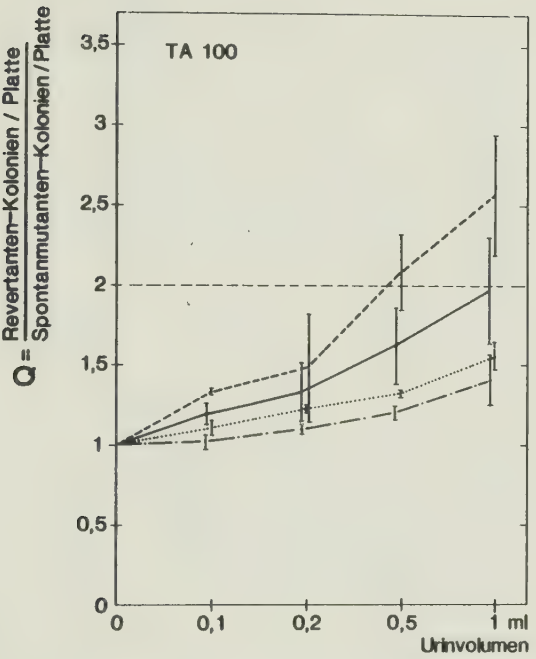


Abb. 13: Quotientenbetrachtung der Mittelwerte bei
TA 100: Cycloph.-Gr. gesamt (n=5) ———
Cycloph.-Gr. mit Q > 2 (n=2) - - - - -
Cycloph.-Gr. mit Q < 2 (n=3) .....
Ifosphamid-Gr. gesamt (n=5) —·—

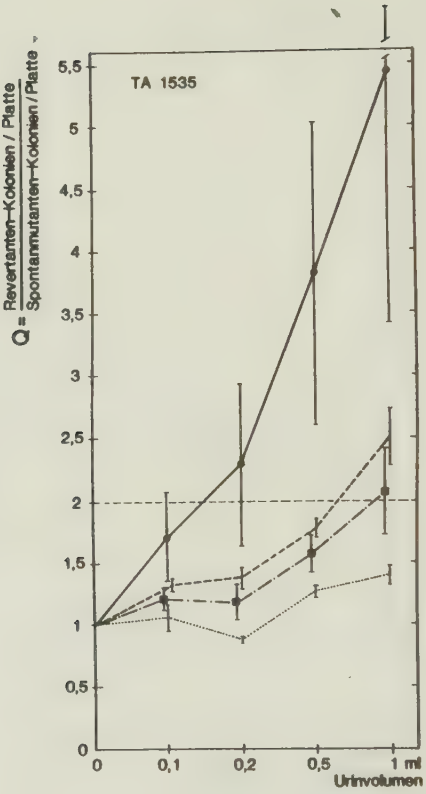


Abb. 14: Quotientenbetrachtung der Mittelwerte bei
TA 1535: Cycloph.-Gr. gesamt (n=5) ———
Ifosph.-Gr. gesamt (n=5) —·—
Ifosph.-Gr. mit Q > 2 (n=3) - - - - -
Ifosph.-Gr. mit Q < 2 (n=2) .....

## 3.4. Ifosphamid-Gruppe

Tabelle 8 und die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Ergebnisse der Ifosphamid-Gruppe. Untersucht wurden hier 5 Urinproben von fünf verschiedenen Patienten.

Der Stamm TA 1535 zeigte bei 3 Proben mutagene Aktivitäten an. Alle drei Patienten waren mit höheren Dosen (2 x 3 g, 1 x 3,75 g) therapiert worden als die zwei Patienten, die im Urin keine Mutagenität zeigten (2 x 2 g). Eine mindestens 99 %-ige Dosis-Wirkungs-Beziehung war gegeben.

Tab. 8: Ifosphamid-Gruppe (n=5): Anzahl Kolonien/Platte

a) 99,9 % Dosis-Wirkungs-Beziehung
b) 99 % Dosis-Wirkungs-Beziehung
c) keine Dosis-Wirkungs-Beziehung

| Patient | Spontan. | 0,01 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 ml Urinvolumen | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bei TA 1535 | | | | | | | |
| a) R | 57,50 | 56,0 | 69,5 | 87,0 | 111,0 | 171,0 | x |
| b) B | 84,50 | 81,5 | 116,0 | 123,5 | 152,0 | 173,5 | x |
| K | 61,75 | 59,5 | 85,0 | 72,0 | 99,0 | 154,5 | x |
| c) L | 53,00 | 54,0 | 64,0 | 47,5 | 70,5 | 80,5 | |
| W | 57,50 | 44,5 | 52,5 | 50,5 | 69,5 | 73,5 | |
| Bei TA 100 | | | | | | | |
| a) K | 149,25 | 168,5 | 161,5 | 169,0 | 196,5 | 245,5 | |
| W | 160,75 | 171,0 | 169,5 | 194,0 | 195,5 | 229,0 | |
| b) R | 160,75 | 161,5 | 181,0 | 173,0 | 203,0 | 270,0 | |
| c) B | 236,50 | 221,5 | 213,5 | 239,5 | 288,0 | 335,0 | |
| L | 157,00 | 149,5 | 152,0 | 169,0 | 166,5 | 137,0 | |

Erläuterung siehe Tabelle 6.

Beim Stamm TA 100 zeigten sich nur in 2 Fällen (beide mit 3 g Ifosphamid) mäßig erhöhte Revertantenzahlen mit mindestens 99 %-iger Dosis-Wirkungs-Beziehung.

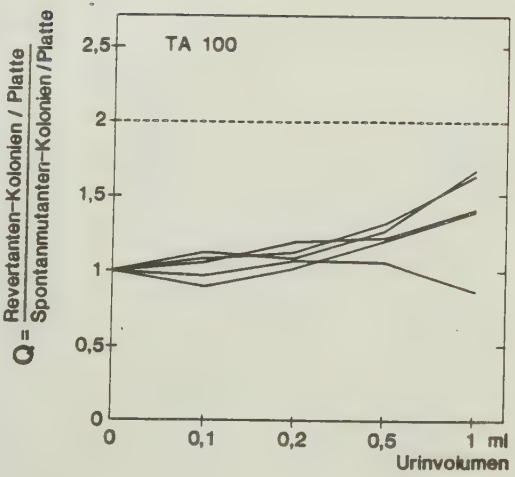


Abb. 15:
Ifosphamid-Gruppe (n=5): Quotientenbetrachtung der Einzelwerte bei TA 100.

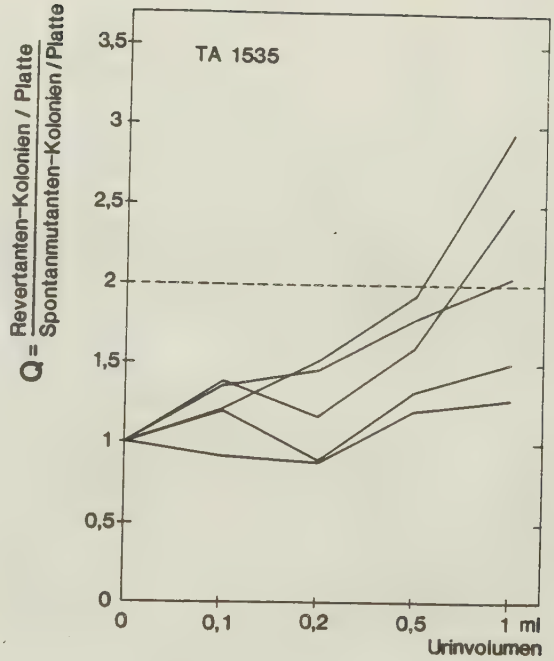


Abb. 16:
Ifosphamid-Gruppe (n=5): Quotientenbetrachtung der Einzelwerte bei TA 1535.

### 3.5. Vergleichende Betrachtung

Bei der vergleichenden Betrachtung der untersuchten Gruppen ergaben sich beim Stamm TA 1535 für die Cyclophosphamid-Gruppe eindeutig die höchsten Werte. Für die Gesamtgruppe der Harnblasenkarzinompatienten und der Ifosphamid-Therapierten lagen die Werte etwa auf gleicher Höhe, während die Phenacetinabuser-Gruppe gesamtbetrachtet durchschnittlich die niedrigsten Revertantenzahlen aufwies (Abb. 17).

Betrachtet man die untersuchten Gruppen genauer, so zeigt sich bei den Harnblasenkarzinompatienten eine Gruppe, deren durchschnittlicher Mutagenitätsquotient bei 3 liegt. Auch bei den Phenacetinabusern zeigen sich zwei Fälle, die in etwa den gleichen Quotienten erreichen. Bei den Ifosphamid-Therapierten finden sich 3 Personen mit einem Quotienten um 2,5 im Gegensatz zu den restlichen 2 Patienten, die deutlich unter 1,5 liegen. Ähnlich ist das Bild bei den Phenacetinabusern, bei denen 4 Patienten deutlich unter 1,5 liegen. Nur bei der Harnblasenkarzinom-Gruppe zeigt sich noch eine Abstufung zwischen eindeutig negativem Befund und der oben erwähnten positiven Gruppe um Q = 3; es findet sich eine Untergruppe von 7 Patienten, die im Ergebnis durchschnittlich um den Quotienten 2 liegen und damit eine fragliche Mutagenität aufweisen (Abb. 17).
Etwas weniger deutlich ist das Bild, wenn man die Testergebnisse beim Stamm TA 100 betrachtet:
Beim Vergleich der Gesamtgruppen ergaben sich wieder die höchsten Werte in der Cyclophosphamid-Gruppe, die dann bei der Harnblasenkarzinom-Gruppe, der Ifosphamid-Gruppe bis zur Gruppe der Phenacetinabuser auf immer kleinere Werte abfallen (Abb. 18).

Bei Betrachtung der Untergruppen ergibt sich in der Cyclophosphamid-Gruppe eine Differenzierung in eine deutlich positive, Q bei 2,5 und eine eher negative Gruppe um Q = 1,5.

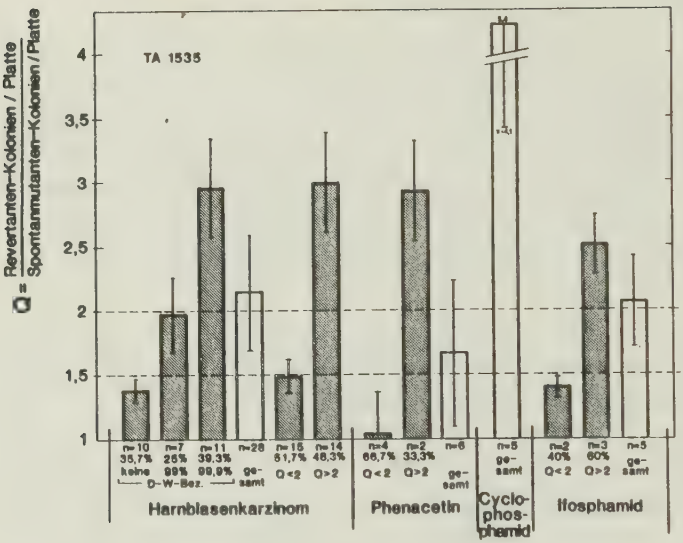


Abb. 17: Übersicht über die Mittelwerte in der höchsten Urinkonzentration nach Gruppen geordnet bei TA 1535.

Bei den Ifosphamid-Therapierten ergibt sich bei keinem der Patienten ein ausreichender Hinweis auf Mutagenität, während sich bei den Phenacetinabusern ein eher analoges Bild zum Stamm TA 1535 ergibt; auch hier sind dieselben 2 Patienten mit erhöhten Werten (um Q = 2) deutlich unterschieden von 5 Patienten mit negativem Befund. Analog zu TA 1535 zeigte sich auch in der Harnblasenkarzinom-Gruppe eine Anzahl von Personen (n=7) mit gleich hohen Werten, wie die Untergruppe (n=2) bei den Phenacetinabusern um Q = 2. Allerdings hat sich bei TA 100 im Vergleich zu TA 1535 der Anteil der negativen Befunde auf 48 % erhöht, und auch die Zwischengruppe mit 8 Patienten weist hier eher auf fehlende Mutagenität hin (Abb. 18).

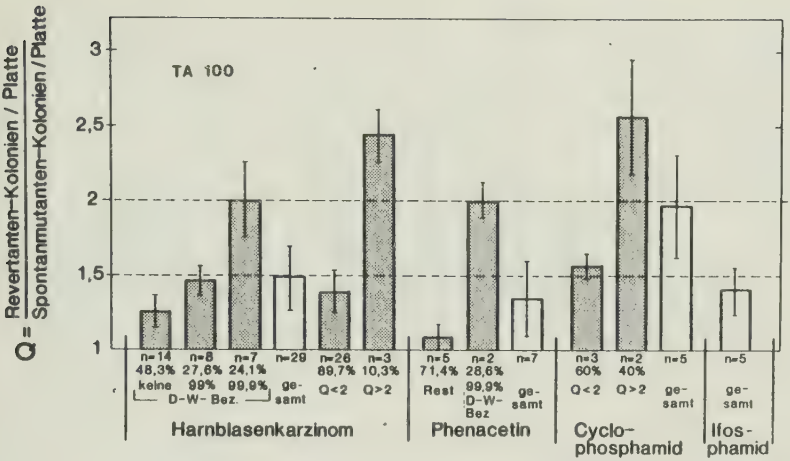


Abb. 18: Übersicht über die Mittelwerte in der höchsten Urinkonzentration nach Gruppen geordnet bei TA 100.

Abbildung 19 (s. nächste Seite) zeigt schließlich eine vergleichende Übersicht über alle untersuchten Proben.

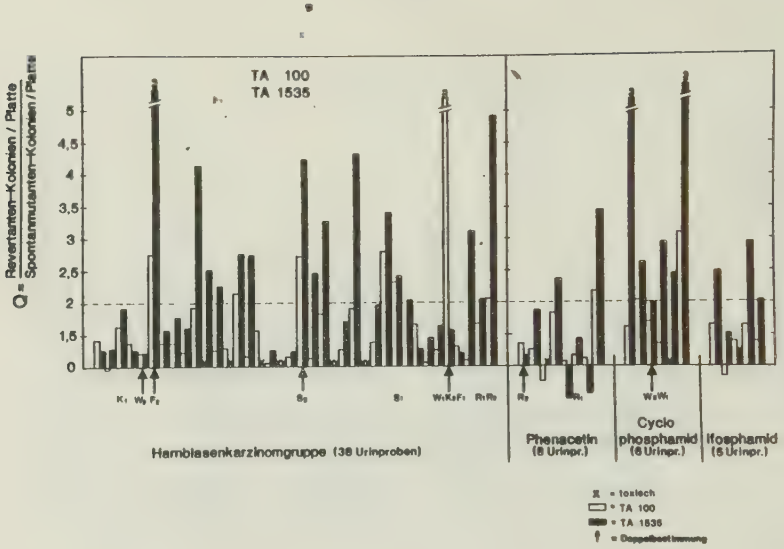


Abb. 19: Übersicht über die Einzelwerte in der höchsten Urinkonzentration nach Gruppen geordnet bei TA 100 und TA 1535.

## 4. DISKUSSION

Der AMES-Test wurde als etabliertes bakterielles Mutagenesetestverfahren bei einer ca. 85 %-igen Nachweissicherheit für Mutagene sowie einem geringen Anteil falsch positiver Ergebnisse (10 - 30 %); (38) verwandt, um Hinweise auf mutagene Aktivitäten im Urin ausgewählter klinischer Patientengruppen zu finden.
Wichtig für ein solches Screening ist die Verwendung mehrerer Bakterienstämme sowie die Testung in steigenden Konzentrationen, um Dosis-Wirkungs-Beziehungen verifizieren und sie mit Hilfe geeigneter statistischer Verfahren absichern zu können.
Für Kliniker und Arbeitsmediziner eröffnet der AMES-Test mit Körperflüssigkeiten die Möglichkeit, mutagene Belastungen von Patienten und bestimmten Personenkreisen zu erkennen und dadurch im Vorfeld der Krebsentstehung einzugreifen.
Uns interessierte im Rahmen dieser Untersuchung, inwieweit mutagene Faktoren im Urin vorhanden sind, die direkt, d. h. ohne metabolische Umwandlung, auf das Urothel einwirken können.

### 4.1. Diskussion der Ergebnisse

Der Vergleich der untersuchten Gruppen ergab, wie erwartet, bei den Cyclophosphamid-Therapierten das deutlichste Ergebnis. Hier wurden die höchsten Revertantenraten registriert. Auch war der Anteil der Patienten, die mutagene Aktivität zeigten, am höchsten.
Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Pak (80), der im Urin von mit Cyclophosphamid behandelten Ratten bei Verwendung des Stammes TA 100 ohne metabolische Aktivierung mutagene Aktivität nachwies. Diesen Nachweis konnte Pak jedoch bei 35 Patienten unter Chemotherapie nicht wiederholen.
Demgegenüber wiesen Minnich et el. (67) mit TA 1535 ebenfalls

ohne metabolische Aktivierung eindeutig Aktivitäten im Urin von Patienten nach, die Cyclophosphamid oder andere Chemotherapeutika erhalten hatten. Weitere Bestätigungen für die Ergebnisse finden sich in Untersuchungen von Siebert (89), der schon 1973 über mutagene Aktivitäten im Urin nach Cyclophosphamidgabe berichtete.
Zu identischen Ergebnissen kamen Falck (31) und Bos (9) bei Personen, die beruflichen Umgang mit Zytostatika hatten. Minnich (67) zeigte, daß bei in-vitro-Testung von Cyclophosphamid eine metabolische Aktivierung notwendig ist, um einen Mutagenitätsnachweis zu erhalten. Auch Hales (42) berichtet über Basenpaarsubstitutions-Mutationen bei TA 1535 nach metabolischer Umsetzung von Cyclophosphamid. Diese Feststellungen stehen im Einklang mit dem Nachweis von vier aus Cylophosphamid entstandenen Metaboliten (7), die wahrscheinlich für die mutagene Aktivität im AMES-Test verantwortlich sind. Nach Suling (92) korreliert die mutagene Aktivität des Urins Cyclophosphamid-behandelter Mäuse mit der Ausscheidung des Metaboliten nor-nitrogen-mustard (nor-HN-2).
Die epidemiologischen und klinischen Hinweise auf die blasenkarzinominduzierende Wirkung von Cyclophosphamid, wie sie von Durkee (28) und Fuchs et al. (35) gegeben wurden, lassen sich somit experimentell, zumindest was die Mutagenität betrifft, bestätigen.

Beim Ifosphamid, einer dem Cyclophosphamid verwandten Verbindung, liegt die mutagene Aktivität deutlich niedriger. Der Test bewegt sich hier offenbar an der Grenze seiner Sensitivität, da nur bei den Patienten, die die höhere Dosierung erhalten hatten, ein Mutagennachweis geführt werden konnte. Harzmann (44) berichtet über gehäuftes Auftreten von hämorrhagischen Zystitiden und höherer Inzidenz des Harnblasenkarzinoms unter Ifosphamid-Therapie. Die experimentell gefundenen Werte weisen in diese Richtung, allerdings bei einem deutlich verminderten Risiko im Vergleich zum Cyclophosphamid.

Die anhand epidemiologischer Studien getroffene Feststellung, Phenacetinabusus erhöhe das Risiko an einem Nierenbecken-, Harnleiter- oder Harnblasenkarzinom zu erkranken, wird im Mutagenesetest bestätigt. Mutagene Werte fanden sich beim Stamm TA 1535 in zwei Proben, die auch bei TA 100 die jeweils höchsten Revertantenraten aufwiesen. Es ist anzunehmen, daß bei den positiven Befunden Metaboliten des Phenacetin erfaßt wurden, die im Tierversuch karzinogen wirken (14).
Hinsichtlich der Ursachen für die in 70 % negativen Befunde ist zu vermuten, daß die Konzentration der Metabolite im Sammelzeitraum zu gering war. Nach Shudo (88) wirken die Metaboliten nur schwach mutagen. Nur entsprechend hohe Konzentrationen bewirken demzufolge Veränderungen der Revertantenrate.

Die Gruppe der Patienten mit Harnblasenkarzinom zeigte eine heterogene Zusammensetzung. Je nach Indikatorstamm schwankte der Anteil eines sicheren Mutagennachweises zwischen 24 - 48 %, eines fraglichen Nachweises zwischen 25 - 28 % und eines eindeutig negativen Befundes zwischen 36 - 48 % der Proben. Diese Zahlen spiegeln die Komplexität des Geschehens wieder.
Sowohl vom Alter, den vorliegenden anamnestischen Daten, Tumorausdehnung und Malignitätsgrad her, konnten zwischen den einzelnen Gruppen keine wesentlichen Unterschiede ermittelt werden. Für einen Teil der Patienten muß eine Mutagenbelastung durch ihre Lebensgewohnheiten und/oder durch ihre Umwelt, d. h. eine besondere berufliche Exposition oder Emissionsbelastung, vermutet werden. Bei der negativen Gruppe muß eine Disposition (Onkogene u. a.) diskutiert werden, die auch bei Einwirken geringer Konzentrationen mutagener Substanzen, die unter der Empfindlichkeitsschwelle des Tests liegen, zur Auslösung eines malignen Wachstums führt. Hier ist jedoch auch die bekannt lange Latenzphase bis zur Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms zu berücksichtigen. Das auslösende Agens kann schon lange wieder aus der Umwelt des entsprechenden Individuums verschwunden sein und dennoch den Anlaß für das maligne Wachstum schon vor langer Zeit gegeben haben.

Unter diesen Gesichtspunkten ist auch die Gruppe mit fraglich mutagenen Urinproben zu betrachten.
Bei den 5 doppeltuntersuchten Harnblasenkarzinompatienten war, bis auf eine Ausnahme, bei der jeweils zweiten Urinprobe die mutagene Aktivität erhöht. Es liegt hier die Vermutung nahe, daß dies Folge der im Intervall erfolgten Mitomycin-Behandlung war, wobei hier noch Fragen offen bleiben.

Garner (37) konnte 1982 mutagene Aktivitäten im Urin von Harnblasenkarzinompatienten beim Vergleich mit einer Kontrollgruppe nachweisen. Im Unterschied zur vorliegenden Untersuchung benutzte er jedoch den bacterial fluctuation test unter Verwendung von TA 98 und TA 100, der einer Variation des Standard-AMES-Tests entspricht. Probleme gab es in dieser Studie vor allem durch den Einfluß des Rauchens. In der Nichtrauchergruppe fanden sich signifikante Unterschiede zwischen Erkrankten und Kontrollgruppe.
Im Gegensatz dazu fand Caderni (17) keinen Mutagennachweis im Urin von Harnblasenkarzinompatienten. Er benutzte den Standard-AMES-Test, wie er für die Urintestung beschrieben wird (100) unter Verwendung der Stämme TA 1538 und TA 100. Ebenso konnte Minnich 1976 (67) keinen Mutagennachweis bei 43 maligen erkrankten Patienten (Art der Erkrankung nicht näher definiert) führen. Auch in einer über 800 Personen umfassenden Kontrollgruppe konnte mit dem Stamm TA 1535 bis auf 2 Personen keine mutagene Aktivität nachgewiesen werden.

## 4.2. Kritik des AMES-Tests

Die unterschiedlichen, teils widersprüchlichen Ergebnisse der oben angeführten Arbeiten weisen auf ein wesentliches Problem im Umgang mit Mutagenesetests hin. Hier ganz speziell im Umgang mit dem von Ames und Mitarbeitern entwickelten Salmonella-typhimurium-Mutagenesetest.

Was die technische Durchführung des Tests betrifft, so mangelt es an einer ausreichenden Standardisierung, d. h. es werden häufig Modifikationen vorgenommen. Die o. g. Autoren benutzten verschiedene Testtechniken (Plattentest, bacterial fluctuation test), unterschiedliche Aufbereitung der Testsubstanz, verschiedene Konzentrationen und Teststämme. Vergleiche sind somit erschwert.

Longstaff (58) beschreibt einige praktische Probleme in der Durchführung des Plattentests. Unter anderem berichtet er über die Schwierigkeit, die Spontanmutantenrate konstant zu halten: "Schwankungen zwischen 0 bis zum 3-fachen der veröffentlichten Werte wurden des öfteren gesehen, auch wenn die Positivkontrollen normal reagierten." Ebenso beschreibt Rosenkranz (84) eine "intrinsic variability" der Stämme auch bei rigoroser Anwendung der Richtlinien. Eine kürzlich durchgeführte Studie, an der 38 Labors beteiligt waren, ergab einen "genetic drift" der Testerstämme, der jedoch die inter- und intralaborativen Abweichungen nicht wesentlich erklärt. Abweichungen von bis zu 127 % zwischen den Labors wurden beobachtet (1).

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchung ergaben sich erhöhte Spontanmutantenraten für den Stamm TA 1535 und weniger ausgeprägt für den Stamm TA 100. Wiederholte Gram-Färbungen schlossen eine bakterielle Verunreinigung der Stämme aus. Eine Erhöhung der Spontanmutantenrate durch Verwendung von Subkulturen wird beschrieben (84). Da bei unserer Vorgehensweise Subkulturen erzeugt wurden, scheint dies die wahrscheinlichste Ursache für die Erhöhung zu sein.
Weiterhin wird eine Erhöhung der Spontanmutantenrate durch Verwendung ethylenoxidsterilisierten Instrumentariums, wie Petrischalen oder Reagenzröhrchen beschrieben (4, 76, 38). Ethylenoxid wirkt direkt mutagen auf TA 1535 und TA 100. Ablagern der Plastikartikel und das dadurch ermöglichte Abgasen soll diese Beeinflussung verhindern (38). Bei der Untersuchung wurde darauf geachtet, nur abgelagerte Materialien

zu verwenden. Eine Beeinflussung der Spontanmutantenrate im Rahmen dieser Untersuchung ist nicht auszuschließen. Mehrere Arbeiten beschreiben den Einfluß von durch die Nährbouillon und/oder durch den Urin zugefügtem Histidin (8, 68). Nach Mohtashamipur (68) wird jedoch der von uns verwendete Plattentest dadurch nicht so stark beeinflußt, wie der bacterial fluctuation test. Yamasaki und Ames (100) halten die Zugabe kleiner Urinmengen in ihrem Einfluß auf die Spontanmutantenrate für unerheblich. Das beinhaltet jedoch den Nachteil, schwache Mutagene nicht zu erfassen. Um deutlichere Ergebnisse zu erzielen, müssen Konzentrationsanreicherungen vorgenommen werden, bei denen Histidin entfernt wird, z. B. durch Verwendung eines XAD 2 Jonenaustauschharzes (100, 68).

## 4.3. Einordnung des Tests und Ausblick

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Einschätzung solcher Testergebnisse bezüglich ihrer karzinogenen Potenz. Brusick (15) fand für den AMES-Test eine 80 %-ige Korrelation, was den Vergleich von Mutationsinduktion mit Tumorwachstum in Mäusen und Ratten betrifft.

Garner (36) meint, daß "Mutagenitätstests sehr wertvoll sind in der Bestimmung von karzinogenem Potential, jedoch nicht für die Einschätzung von karzinogener Stärke". Das bedeutet eine Relativierung der Bedeutung von Mutagenitätstests, die ein durchaus nützliches Instrument auf der Suche nach karzinogenen Stoffen und Mechanismen darstellen. In sinnvoller Kombination können sie eine Auswahl treffen für den Tierversuch, der als komplexes Modell noch nicht ersetzt werden kann.

Die bisherigen Erfahrungen mit dem bakteriellen Mutagenesetest lassen es berechtigt erscheinen, dieses Testverfahren bei entsprechend exponierten Risikogruppen im Vergleich zu "gesunden" Kontrollgruppen sowohl prospektiv als auch retrospektiv anzuwenden.

Der breiten Anwendung des Tests steht bisher seine personelle, materielle und zeitliche Aufwendigkeit entgegen. Eine Automatisierung des Untersuchungsprogramms, etwa durch den Mutascreen[1], kann hier Abhilfe schaffen. Es eröffnen sich Möglichkeiten der Zusammenarbeit zwischen Arbeitsmedizinern, Epidemiologen und Urologen. Denkbar ist, daß bei einer Optimierung der Kooperation ein Konzept der präventiven Onkologie gerade im Hinblick auf das Harnblasenkarzinom realisiert werden kann.

[1] Mutascreen$^{R}$ von Labsystems Oy, Pulttitie 9 - 11, 00810 Helsinki 81, Finland

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde die klinische Anwendung des bakteriellen Mutagenitätstests nach AMES zur Feststellung mutagener Aktivitäten im Urin von Harnblasenkarzinompatienten der Stadien $T_A$-$T_4$ (n = 33), von Phenacetinabusern (n = 7) sowie von Patienten unter Cyclophosphamid- (n = 6) oder Ifosphamid-Therapie (n = 5).
Verwendet wurden die Standard-Testerstämme Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535 und TA 1537 ohne metabolisierende Komponente.

Mutagene Aktivitäten fanden sich mit dem Stamm TA 1535 bei 45 % der Harnblasenkarzinompatienten, bei 33 % der Phenacetinabuser, bei 100 % der Cyclphosphamid- und bei 60 % der Ifosphamid-Therapierten. Übereinstimmende, jedoch weniger ausgeprägte Befunde ergaben sich bei Verwendung des Stammes TA 100.

Untersuchungen, die mutagene Aktivitäten im Urin von Cyclosphosphamid-Therapierten beschreiben, ließen sich eindrucksvoll bestätigen. Für Ifosphamid, wie für Phenacetin wird eine schwächere mutagene Wirkung diskutiert. Beim Phenacetin liegen dazu bereits gesicherte epidemiologische und pathologisch-anatomische Daten vor.

Die Gruppe der Harnblasenkarzinompatienten wies deutlich erhöhte mutagene Aktivität auf. Diskutiert werden deren Ursachen, die grenzwertigen und negativen Befunde, sowie mögliche weiterführende Untersuchungen.

Der Test selbst wird einer kritischen Betrachtung unterzogen. Zur Bedeutung der Mutagenitätstests wird Stellung genommen, ihr Wert für die präventive Onkologie, sowie für die Arbeitsmedizin wird diskutiert.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS


1. AGNESE, G., D. RISSO and S. DE FLORA: Statistical evaluation of inter- and intra-laboratory variations of the Ames test, as related to the genetic stability of Salmonella tester strains. Mutat. Res., 130 (1), 27 - 44 (1984)

2. ALBANO, G., A. CARERE, R. CREBELLI and R. ZITO: Mutagenicity of commercial hair dyes in Salmonella typhimurium TA 98. Food Chem. Toxicol., 20 (2), 171 - 5 (1982)

3. AMES, B. N., J. MCCANN and E. YAMASAKI: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 31, 347 - 364 (1975)

4. AMES, B. N.: Persönliche Mitteilung. Supplement to the Methods Paper. (Revised June 1979)

5. AMMENHEUSER, M. M. and M. E. WARREN: Detection of mutagens in the urine of rats following topical application of hair dyes. Mutat. Res., 66 (3), 241 - 5 (1979)

6. ANTHONY, H. M. and G. M. THOMAS: Tumors of the urinary bladder: An analysis of the occupations of 1030 patients in Leeds, England. J. Natl. Cancer Inst. 45, 401 - 405 (1970)

7. BALBINDER, E., C. I. REICH, D. SHUGARTS, J. KEOGH, R. FIBIGER, T. JONES and A. BANKS: Relative mutagenicity of some urinary metabolites of the antitumor drug cyclophosphamide. Cancer Res., 41 (7), 2967 - 72 (1981)

8. BARBER, E. D., W. H. DONISH and K. R. MUELLER: The relationship between growth and reversion in the Ames Salmonella plate incorporation assay. Mutat. Res. 113, 89 - 101 (1983)

9. BOS, R. P., J. L. G. THEUWS and P. TH. HENDERSON: Influence of smoking on urinary mutagenicity after occupational exposure to cytostatic drugs. Mutat. Res. 113, 235 (1983)

10. BOS, R. P., J. L. G. THEUWS and P. T. HENDERSON: Excretion of mutagens in human urine after passive smoking. Cancer Lett. 19, 85 - 90 (1983)

11. BOS, R. P., A. O. LEENAARS, J. L. G. THEUWS and P. T. HENDERSON: Mutagenicity of urine from nurses handling cytostatic drugs, influence of smoking. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 50, 359 - 369 (1982)

12. BOS, R. P., R. M. E. BROUNS, R. VAN DOORN, J. L. G. THEUWS and P. T. HENDERSON: The appearance of mutagens in urine of rats after administration of benzidine and some other aromatic amines. Toxicology 16, 113 - 122 (1980)

13. BOS, R. P., R. M. E. BROUNS, R. VAN DOORN, J. L. G. THEUWS and P. T. HENDERSON: Involvement of non-oxidative enzymes in mutagenic activation of urine from rats, given benzidine and some other aromatic amines. Toxicology 21, 223 - 233 (1981)

14. BRUNNER, F. P., L. RICHTMANN, G. THIEL und U. C. DUBACH: Tumoren der ableitenden Harnwege und Analgetika-Abusus. Schweiz. Med. Wochenschr., 108 (27), 1013 - 9 (1978)

15. BRUSICK, D.: Mutagenicity and carcinogenicity correlations between bacteria and rodents. Ann. NY Acad. Sci. 407, 164 - 76 (1983)

16. BURNET, C. M., C. M. FUCHS and J. F. CORBETT: Mutagenicity studies on urine concentrates from female users of dark hair color products. Drug. Chem. Toxicology 2 (3), 283 - 293 (1979)

17. CADERNI, G., P. DOLARA, A. CONSTANTINI, G. BARBAGLI and A. CALZOLAI: Determination of urinary mutagens in patients with urinary tract cancer. Eur. Urol. 8, 243 - 246 (1982)

18. CALABRESE, E. J.: Is the role of the environment in carcinogenesis overestimated? Medical Hypotheses 5 (1), 5 - 14 (1979)

19. CANTOR, K. P., R. HOOVER, T. J. MASON and L. J. MCCABE: Association of cancer mortality with halomethanes in drinking water. J. Natl. Cancer Inst. 61, 979 (1978)

20. CARTWRIGHT, R.: Occupational bladder cancer and cigarette smoking in West Yorkshire. Scand. J. Work. Environ. Health, 8 Suppl 1, 79 - 82 (1982)

21. CARTWRIGHT, R. A. and R. W. GLASHAN: Epidemiology of industrial bladder cancer in West-Yorkshire (meeting abstract). Br. J. Cancer 44, 277 (1981)

22. CASE, R. A. M., M. E. HOSKER, D. B. MCDONALD and J. T. PEARSON: Tumors of the urinary bladder in workman engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical indsutry. Part I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphtylamine. Br. J. Ind. Med. 38, 240 - 246 (1954)

23. CLEMMESEN, J. and V. BREMERSKOV: Parallel morbidity age-curves for neoplasms of lung and bladder. Biomedicine, 19, 198 - 199 (1973)

24. COLE, P.: Lower urinary tract. In: Schottenfeld D (ed) Cancer epidemiology and prevention. Thomas, Ill., p 233 - 262 (1975)

25. COLE, P., R. HOOVER, G. H. FRIEDELL: Occupation and cancer of the lower urinary tract. Cancer 29, 1250 - 1260 (1972)

26. COLE, P., R. R. MONSON, H. HANING and G. H. FRIEDELL: Smoking and cancer of the lower urinary tract. N. Engl. J. Med. 284, 129 - 134 (1971)

27. CONNOR, T. H., M. STOECKEL, J. EVRARD and M. S. LEGATOR: The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice. Cancer Res. 37, 629 - 633 (1977)

28. DURKEE, C. and R. BENSON: Bladder cancer following administration of cyclophosphamide. Urology 16 (2), 145 - 8 (1980)

29. Editorial: Cancer and chlorinated water. Lancet 1 (8230), 1142 (1981)

30. FALCK, K., M. SORSA, H. VAINIO and I. KILPIKARI: Mutagenicity in urine of workers in rubber industry. Mutat. Res. 79, 45 - 52 (1980)

31. FALCK, K., P. GRÖHN, M. SORSA, H. VAINIO, E. HEINONEN and L. R. HOLSTI: Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. Lancet 1 (8128), 1250 - 1 (1979)

32. FONG, L. Y., J. H. HO and D. P. HUANG: Preserved foods as possible cancer harzads: WA rats fed salted fish have mutagenic urine. Int. J. Cancer 23 (4), 542 - 546 (1979)

33. FORTH, W.: Karzinogene, teratogene und mutagene Arzneimittelwirkungen. Deutsches Ärzteblatt Ausg. B, Heft 8/83, 80. Jahrg., S. 24 - 26

34. FRIEDRICh, U.: Der "Ames-Test" zum Aufsprüen mutagener und cancerogener Stoffe. Biologie in unserer Zeit, 9. Jahrg. 1979/Nr. 4, S. 97 - 102

35. FUCHS, E. F., R. KAY, R. POOLE, J. M. BARRY and H. D. PEARSE: Uroepithelial carcinoma in association with cyclophosphamide ingestion. J. Urol. 126, 544 - 545 (1981)

36. GARNER, R. C.: In vitro assays to predict carcinogenicity? In: NORPOTH, GARNER (eds.): Short-term test systems for detecting carcinogens. pp 5 - 18, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1980

37. GARNER, R. C., A. J. MOULD, V. L. SMITH, R. A. CARTWRIGHT and B. RICHARDS: Mutagenic urine from bladder cancer patients. Lancet 2 (8294), 389 (1982)

38. GERICKE, D.: Zur Problematik der mikrobiellen Mutagenitätstests. Onkologie 5, 30 - 35 (1982)

39. GERICKE, D., H. GRÖTSCH, R. HARZMANN and K. H. BICHLER: Carcinogen control in the urine of dogs during bladder carcinogenesis. Naturwissenschaften 64, 392 (1977)

40. GROSSMANN, H. B.: Das Blasenkarzinom. Extr. Urol. 3, 55 - 84 (1980)

41. HABS, M. und D. SCHMÄHL: Karzinogene Substanzen in der Nahrung. Inn. Med. 6, 237 - 249 (1979)

42. HALES, B. F.: Relative mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and two of its structural analogs. Biochem. Pharmacol. 32 (24), 3791 - 5 (1983)

43. HARTGE, P., R. HOOVER, D. W. WEST and J. L. LYON: Coffee drinking and risk of bladder cancer. JNCI 70 (6), 1021 - 6 (1983)

44. HARZMANN, R.: Hämorrhagische Zystitis: Differentialdiagnose, Diagnostik und Therapie. Med. Klin. 78, 84 - 90 (Nr. 3) (1983)

45. HARZMANN, R., D. GERICKE und K.-H. BICHLER: Präventive Onkologie beim Harnblasenkarzinom: Karzinogenerfassung im Urin. Helv. Chir. Acta 49, 409 - 414 (1982)

46. HARZMANN, R., D. GERICKE, A. ALTENÄHR und K.-H. BICHLER: Chemische Induktion transplantabler Harnblasenurothelkarzinome des Hundes. Urol. Int. 35, 340 - 356 (1980)

47. HARZMANN, R., D. GERICKE, ST. H. FLÜCHTER und K.-H. BICHLER: Möglichkeiten der Labordiagnostik zur Erfassung von Harnblasenkarzinogenen.
In: BICHLER, HARZMANN (Eds.): Das Harnblasenkarzinom, pp 25 - 36, Springer, Berlin - Heidelberg - New York - Tokyo 1984

48. HICKS, R. M.: Promotion: Is saccharin a promoter in the urinary bladder? Food Chem. Toxicol. 22 (9), 755 - 760 (1984)

49. HOWE, G. R., J. D. BURCH, A. B. MILLER, G. M. COOK, J. ESTEVE, B. MORRISON, P. GORDON, L. W. CHAMBERS, G. FODOR and G. M. WINSOR: Tobacco use, occupation, coffee, various nutrients, and bladder cancer. JNCI, 64 (4), 701 - 13 (1980)

50. INAMASU, T., KITAMORI, S., M. ISHIZAWA, A. HISANAGA and N. ISHINICHI: A mutagenicity assay of urine of workers in a refinery. Sangyo Igaku 23, 640 - 641 (1981)

51. JONCKHEERE, A. R.: A distribution free k-sample test against ordered alternatives. Biometrica 41, 133 - 145 (1954)

52. KEMPER, J. D.: Häufigkeit des Harnblasenkarzinoms nach Cyclophosphamid-Behandlung. Akt. urol. 4/1980, 237 - 238

53. KILIAN, D. J., T. G. PULLIN, T. H. CONNER, M. S. LEGATOR and H. N. EDWARDS: Mutagenicity of epichlorhydrin in the bacterial assay system: Evaluation by direct in vitro activity and in vivo activity of urine from exposed humans and mice. Mutat. Res. 53, 72 (1978)

54. KNOTH, A., H. BOHN und F. SCHMIDT: Passivrauchen als Lungenkrebsursache bei Nichtraucherinnen. Med. Klin. 78, 66 - 69 (Nr. 2) (1983)

55. KRIEBEL, D., B. COMMONER, D. BOLLINGER, A. BRONSDON, J. GOLD and J. HENRY: Detection of occupational exposure to genotoxic agents with a urinary mutagen assay. Mutat. Res. 108, 67 - 79 (1983)

56. KUNZE, E.: Die multifaktorielle Mehrstufenkarzinogenese am Harnblasenurotehl.
In: BICHLER, HARZMANN (Eds.): Das Harnblasenkarzinom. pp 37 - 62, Springer, Berlin - Heidelberg - New York - Tokyo 1984

57. LAIRES, A., H. BORBA, J. RUEFF, M. I. GOMES and M. HALPERN: Urinary mutagenicity in occupational exposure to mineral oils and iron oxide particles. Carcinogenesis 3, 1077 - 1079 (1982)

58. LONGSTAFF; E.: Some practical problems experienced in attempts to predict carcinogenicity from short-term tests.
In: NORPOTH, GARNER (Eds.): Short-term test systems for detecting carcinogens, pp 295 - 301, Springer. Berlin - Heidelberg - New York 1980

59. MALAVEILEL, C., M. FRIESEN, A. M. CAMUS, L. GARREN, A. HAUTEFEUILLE, J. C. B'ER' EZIAT, P. GHADIRIAN, N. E. DAY and H. BARTSCH: Mutagens produced by the pyrolysis of opium and its alkaloids as possible risk factors in cancer of the bladder and oesophagus. Carcinogenesis 3 (5), 577 - 85 (1982)

60. MARRETT, L. D., S. D. WALTER, J. W. MEIGS: Coffee drinking and bladder cancer in Connecticut. Am. J. Epidemiol. 117 (2), 113 - 27 (1983)

61. MCCANN, J. and B. N. AMES: Discussion paper: The detection of mutagenic metabolites of carcinogens in urine with the salmonella/microsome test. Ann. o. the N. Y. Academy o. Sciences 269, 21 - 25 (1975)

62. MCCANN, J., L. HORN and J. KALDOR: An evaluation of salmonella (Ames) test data in the published literature: application of statistical procedures and analysis of mutagenic potency. Mutat. Res. 134 (1), 1 - 47 (1984)

63. MCCOY, E. C., R. HANKEL, K. ROBBINS, H. S. ROSENKRANZ, J. G. GINFFRIDA and D. V. BIZZARI: Presence of mutagenic substances in the urines of anesthesiologists. Mutat. Res. 53, 71 (1978)

64. METTLIN, C. and S. GRAHAM. Dietary risk factors in human bladder cancer. Am. J. Epidemiol. 110 (3), 255 - 63 (1979)

65. MIHATSCH, M. J., T. MANZ, C. KNÜSLI, H. O. HOFER, M. RIST, R. GUETG, G. RUTISHAUSER und H. U. ZOLLINGER: Phenacetinabusus III. Maligne Harnwegstumoren bei Phenacetinabusus in Basel 1963 - 1977. Schweiz. med. Wschr. 110, 255 - 264 (1980)

66. MILLER, C. T. and D. R. STOLTZ: Mutagenicity induced by lyophilization or storage of urine from isoniazid-treated rats. Mutat. Res. 56, 289 - 293 (1978)

67. MINNICH, V., M. E. SMITH, D. THOMPSON and S. KORNFELD: Detection of mutagenic activity in human urine using mutant strains of slamonella typhimurium. Cancer 38, 1253 - 1258 (1976)

68. MOHTASHAMIPUR, E. and K. NORPOTH: Bacteriological determination of the mutagenic activites in human urine: Methodological aspects and experiences. Vortrag auf dem 7. Symposium für experimentelle Urologie, Tübingen 1984

69. MOMMSEN, S. and J. AAGARD: Tobacco as a risk factor in bladder cancer. Carcinogenesis 4 (3), 335 - 8 (1983)

70. MOMMSEN, S. and J. AAGARD: Occupational exposures as risk indicator of male bladder carcinoma in a predominantly rural area. Acta Radiol. (Oncol.) 23, (2 - 3), 147 - 52 (1984)

71. MOMMSEN, S., J. AAGARD and A. SELL: An epidemiological case - control study of bladder cancer in males from a predominantly rural district. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18 (11), 1205 - 10 (1982)

72. MOMMSEN, S., J. AAGARD and A. SELL: A case - control study of female bladder cancer. Eur. J. Cancer Clin. Oncol 19 (6), 725 - 9 (1983)

73. MORRISON, A. S., J. E. BURING, W. G. VERHOEK, K. AOKI, I. LECK, Y. OHNO and K. OBATA: Coffee drinking and cancer of the lower urinary tract. JNCI 68 (1), 91 - 94 (1982)

74. MÜNZNER, R.: Letter to the Editor. Mutagenicity testing of the urine of rats treated with amaranth. Fd. Cosmet. Toxicol. 17, 563 (1979)

75. NAJEM, G. R., D. B. LOURIA, J. J. SEEBODE, I. S. THIND, J. M. PRUSAKOWSKI, R. B. AMBROSE and A. R. FERNICOLA: Life time occpuation, smoking, caffeine, saccharine, hair dyes and bladder carcinogenesis. Int. J. Epidemiol. 11 (3), 212 - 217 (1982)

76. NORPOTH, K.: Qualitätssicherung bei der mikrobiologischen Fremdstofftestung auf Mutagenität im Routine Laboratorium. Staub-Reinhalt. Luft 38, 235 - 239 (1978)

77. NORPOTH, K.: Grundlagen der Prävention bösartiger Urotheltumoren.
In: BICHLER, HARZMANN (Eds.): Das Harnblasenkarzinom, pp 1 - 13, Springer, Berlin - Heidelberg - New York - Tokyo 1984

78. NORPOTH, K., A. REISCH and A. HEINECKE: Biostatistics of Ames-test data.
In: NORPOTH, GARNER (Eds.): Short-term test systems for detecting carcinogens, pp 312 - 322, Springer, Berlin - Heidelberg - New York 1980

79. OBERMEIER, J. and H. FROHBERG: Mutagenicity studies with praziquantel, a new anthelmintic drug: Tissue-, host-, and urine-mediated mutagenicity assays. Arch. Toxicol. (Berl) 38, 149 - 161 (1977)

80. PAK, K., T. IWASAKI, M. MIYAKAWA and O. YOSHIDA: The mutagenic activity of anti-cancer drugs and the urine of rats given these drugs. Urol Res. 7, 119 - 124 (1979)

81. POOL, B. L.: Schnelltests auf Mutagene und Carcinogene. Nachr. Chem. Tech. Lab. 26 Nr. 5, 278 - 282 (1978)

82. PASQUINI, R., S. MONARCA, G. S. SFORZOLINI, R. CONTI and F. FAGIOLI: Mutagens in urine of carbon electrode workers. Int. Arch. Occup. Environ. Health 50, 387 - 395 (1982)

83. REHN, L.: Blasengeschwülste bei Anilinarbeitern. Ann. Klin. Chir. 50, 588 - 600 (1895)

84. ROSENKRANZ, H. S., G. KARPINSKY and E. C. MCCOY: Microbial assays: Evaluation and application to the elucidation of the etiology of colon cancer.
In: NORPOTH, GARNER (Eds.): Short-term test systems for detecting carcinogens, pp. 19 - 57, Springer, Berlin - Heidelberg - New York 1980

85. RUCKSTUHL, J.: Die Gewerbetumoren in der Schweiz. Inaugural-Dissertation. Juris Druck und Verlag Zürich (1969)

86. RÜDIGER, H. W.: Karzinom durch mutierte DNA: Umwelt und Erbanlage entscheiden. Selecta 28, 2894 - 2896 (1982)

87. RUEFF, J., A. LAIRES, M. GOMES, H. BORBA and M. HALPERN: Mutagenicity in urine of workers in the naval industry. Mutat. Res. 113, 301 - 302 (1983)

88. SHUDO, K., T. OHTA, Y. ORIHARA, T. OKAMOTO, M. NAGAO, Y. TAKAHASHI and T. SUGIMURA: Mutagenicities of phenacetin and its metabolites. Mutat. Res. 58, 367 - 370 (1978)

89. SIEBERT, D. and U. SIMON: Cyclophosphamide-Pilote study of genetically active metabolites-Urinary assay with cyclophosphamide (Endoxan, Cytoxan) and Saccharomyces cerevisae. Mutat. Res. 17, 307 - 314 (1973)

90. STASZEWSKI, J.: Cancer of the urinary bladder: International mortality patterns and trends. World Health Statistics Quart. 33, 27 - 41 (1980)

91. SUIT, J. L., A. E. ROGERS, M. E. R. JETTEN and S. E. LURIA: Effects of diet on conversion of aflatoxin B1 to bacterial mutagen(s) by rats in vivo and by rat hepatic microsomes in vitro. Mutat. Res. 46, 313 - 323 (1977)

92. SULING, W. J., R. F. STRUCK, C. W. WOOLLEY and M. SHANNON: Comparative disposition of phosphoramide mustard and other cyclophosphamide metabolites in the mouse using the Salmonella/Mutagenesis assay. Cancer Treat. Rep. 62, 1321 - 1328 (1978)

93. TACACS, S. and A. GOMORI: Nitrate content of drinking water and malignant tumors of the digestive organs and urinary bladder. Egeszssegtudomany 25, 235 - 247 (1981)

94. THERIAULT, G., C. TREMBLAY, S. CORDIER and S. GINGRAS: Bladder cancer in the aluminium industry. Lancet, 1 (8383), 947 - 50 (1984)

95. TOLA, S.: Occupational cancer of the urinary bladder. J. Toxicol. Environ. Health 6 (5 - 6), 1253 - 60 (1980)

96. VINEIS, P., N. SEGNAN, G. COSTA and B. TERACINI: Evidence of a multiplicative effect between cigarette smoking and occupational exposure in the aetiology of bladder cancer. Cancer lett. 14, 285 - 90 (1981)

97. WEGER, N.: Mechanismen der Toxizität und Abschätzung des Toxizitätsrisikos. Deutsch. Ärztebl. 50, 2975 - 2977 (1980)

98. WEINBERG, D. M., R. K. ROOS, T. M. MACK, A. PAGANINI-HILL and B. E. HENDERSON: Bladder cancer etiology. A different perspective. Cancer 51 (4), 675 - 80 (1983)

99. WYNDER, E. L. and R. GOLDSMITH: The epidemiology of bladder cancer. A second look. Cancer 40, 1246 - 1268 (1977)

100. YAMASAKI, E. and B. N. AMES: Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. Proc. Natl. Acad. Sci. 74 No. 8, pp 3555 - 3559 (1977)

```
1
 10 PRINT ""
 20 DIM A(14),J(3),K(3)
 30 PRINT "P R O G R A M M   A M E S - T E S T"
 40 PRINT "NAME:                                "
 50 INPUT Name$
 60 PRINT "VORNAME:                             "
 70 INPUT Vorn$
 80 PRINT "GEB.-DATUM:       "
 90 INPUT Geb$
 100 PRINT "DIAGNOSE:                           "
 110 INPUT Diag$
 120 PRINT "URIN VOM:       "
 130 INPUT Urin$
 140 PRINT "STATION:   "
 150 INPUT Stat$
 160 PRINT "TESTSTAMM: TA   98  TA  100  TA 1535"
 170 PRINT "                                    TA 1537"
 180 INPUT Test$
 190 PRINT ""
 200 PRINT "EINGABE DER MESSERGEBNISSE"
 210 PRINT ""
 220 PRINT "LEERKONTROLLE:   1.PLATTE"
 230 INPUT A(1)
 240 PRINT "                 2.PLATTE"
 250 INPUT A(2)
 260 PRINT "                 3.PLATTE"
 270 INPUT A(13)
 280 PRINT "                 4.PLATTE"
 290 INPUT A(14)
 300 PRINT ""
 310 PRINT "1.KONZENTRATION: 1.PLATTE"
 320 INPUT A(3)
 330 PRINT "                 2.PLATTE"
 340 INPUT A(4)
 350 PRINT ""
 360 PRINT "2.KONZENTRATION: 1.PLATTE"
 370 INPUT A(5)
 380 PRINT "                 2.PLATTE"
 390 INPUT A(6)
 400 PRINT ""
 410 PRINT "3.KONZENTRATION: 1.PLATTE"
 420 INPUT A(7)
 430 PRINT "                 2.PLATTE"
 440 INPUT A(8)
 450 PRINT ""
 460 PRINT "4.KONZENTRATION: 1.PLATTE"
 470 INPUT A(9)
 480 PRINT "                 2.PLATTE"
 490 INPUT A(10)
 500 PRINT ""
 510 PRINT "5.KONZENTRATION: 1.PLATTE"
 520 INPUT A(11)
 530 PRINT "                 2.PLATTE"
 540 INPUT A(12)
 550 PRINT ""
 560 LET A=(A(1)+A(2)+A(13)+A(14))/4
 570 LET B=(A(3)+A(4))/2
 580 LET C=(A(5)+A(6))/2
 590 LET D=(A(7)+A(8))/2
 600 LET E=(A(9)+A(10))/2
 610 LET F=(A(11)+A(12))/2
 611 LET A(1)=(A(1)+A(2))/2
 612 LET A(2)=(A(13)+A(14))/2
 613 LET L=2*A
 620 PRINT "MITTELWERT DER LEERKONTROLLE"
 630 PRINT A
 631 PRINT "DOPPELTE LEERKONTROLLE"
```

```
660 LET Qa=A/A
670 LET Qb=B/A
680 LET Qc=C/A
690 LET Qd=D/A
700 LET Qe=E/A
710 LET Qf=F/A
720 PRINT "QUOTIENTEN DER MITTELWERTE (DOSIS/LEERKONTROLLE) DER 1.-5.
730 PRINT Qb,Qc,Qd,Qe,Qf
740 LET X=0
750 LET Y=0
760 LET Z=3
770 LET Y=1
780 FOR T=Z TO 12
790 IF A(T)>A(Y) THEN X=X+1
800 IF A(T)=A(Y) THEN X=X+.5
810 NEXT T
820 LET Y=Y+1
830 IF Y=3 THEN Z=Z+2
840 IF Y=5 THEN Z=Z+2
850 IF Y=7 THEN Z=Z+2
860 IF Y=9 THEN Z=Z+2
870 IF Y=10 THEN 890
880 GOTO 780
890 PRINT "J=       ";X
900 LET Ej=30
910 LET Sd=7.18795
920 PRINT "E(J)=    ";Ej
930 PRINT "SD(J)=   ";Sd
940 LET Jz=(X-Ej)/Sd
950 PRINT "J*=      ";Jz
960 PRINT "KRITISCHE WERTE FUER J (EINSEITIG)"
970 LET K(1)=1.645
980 LET K(2)=2.326
990 LET K(3)=3.09
1010 LET J(1)=46
1020 LET J(2)=47
1030 LET J(3)=52
1035 PRINT "p=95%";J(1),"p=99%";J(2),"p=99.9%";J(3)
1040 IF X>46 OR X=46 THEN 1100
1050 IF X<46 THEN 1120
1060 IF X>47 OR X=47 THEN 1140
1070 IF X<47 THEN 1160
1080 IF X>52 OR X=52 THEN 1180
1090 IF X<52 THEN 1200
1100 PRINT "MIT p=95%    TEST: P O S I T I V"
1110 GOTO 1050
1120 PRINT "MIT p=95%    TEST: N E G A T I V"
1130 GOTO 1060
1140 PRINT "MIT p=99%    TEST: P O S I T I V"
1150 GOTO 1070
1160 PRINT "MIT p=99%    TEST: N E G A T I V"
1170 GOTO 1080
1180 PRINT "MIT P=99.9%  TEST: P O S I T I V"
1190 GOTO 1210
1200 PRINT "MIT p=99.9%  TEST: N E G A T I V"
1210 IF B>2*A OR B=2*A THEN 1280
1220 IF C>2*A OR C=2*A THEN 1280
1230 IF D>2*A OR D=2*A THEN 1280
1240 IF E>2*A OR E=2*A THEN 1280
1250 IF F>2*A OR F=2*A THEN 1280
1260 PRINT "Revertantenrate kleiner als doppelte Spontanmutantenrate"
1270 GOTO 1300
1280 PRINT "Revertantenrate groesser/gleich doppelte Spontanmutantenr
1300 END
```

Lebenslauf

Hartmut Dietrich

| | |
|---|---|
| 3.1.1958 | geboren in Dagersheim |
| 1965 - 1968 | Besuch der Grundschule in Dagersheim |
| 1968 - 1977 | Besuch des Stiftsgymnasiums Sindelfingen |
| 1977 - 1979 | Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz |
| April 1979 | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| April 1981 | Physikum |
| April 1982 | 1. Teil des Staatsexamens |
| April 1984 | 2. Teil des Staatsexamens |
| Oktober 1984 | Beginn des Praktischen Jahres am Kreiskrankenhaus Böblingen mit dem Wahlfach Kinderheilkunde |
| 8.November 1985 | 3. Teil des Staatsexamens an der Universität Tübingen |
| 18.11.1985 | Erteilung der Approbation als Arzt |
| April 1986 | Assistentenstelle an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Herrenberg |